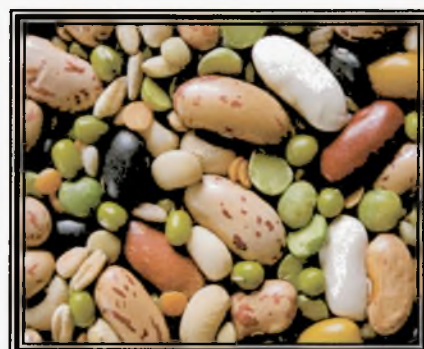




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

*Επίδραση εκχυλισμάτων και κλασμάτων πολυφαινολών που απομονώθηκαν από ελληνικά ψυχανθή στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης.*



*Αθανασιάδης Παντελεήμων*

Λάρισα 2009



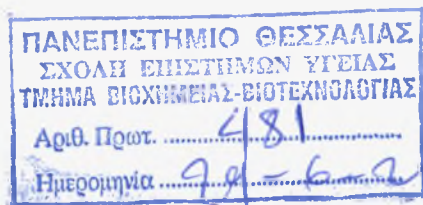
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.:	7378/1
Ημερ. Εισ.:	21-07-2009
Δωρεά:	Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός:	ΠΤ - ΒΒ
	2009
	ΑΘΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087210



**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

*Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων*

**Κουρέτας Δημήτρης (Επιβλέπων)**

*Λέκτορας Κλινικής Χημείας*

**Κοντού Μαρία**

*Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας*

**Λιαδάκη Καλλιόπη**

***Ευχαριστίες***

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Δημήτρη Κουρέτα, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, πρωτίστως για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασία καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Χρύσα Σπανού και Βεσκούκη Άρη για την καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθειά τους τόσο κατά την εκτέλεση των πειραμάτων όσο και στην συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ.
Συντομογραφίες.....	6
Περίληψη.....	7
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>8</b>
1.1. Ψυχανθή.....	8
1.1.1. Σημασία των ψυχανθών στην διατροφή.....	9
1.2. Πολυφαινόλες.....	11
1.2.1. Φαινολικά οξέα.....	12
1.2.2. Φλαβονοειδή.....	13
1.2.3. Λιγνάνια.....	17
1.2.4. Στυλβένια.....	18
1.3. Ελεύθερες ρίζες.....	19
1.3.1. Παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	20
1.3.1.α. Ενδογενείς πηγές.....	20
1.3.1.β. Εξωγενείς πηγές.....	22
1.3.2. Θετικές επιδράσεις.....	22
1.3.3. Αρνητικές επιδράσεις.....	23
1.4. Οξειδωτικό στρες.....	24
1.5. Αντιοξειδωτικά.....	24
1.5.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	25
1.5.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	25
1.6. Οξειδάση της ξανθίνης.....	28
1.6.1. Γενικές πληροφορίες.....	28
1.6.2. Πρωτεϊνική δομή.....	28
1.6.3. Μηχανισμός δράσης οξειδάσης της ξανθίνης.....	29
1.6.4. Ουρικό οξύ .....	29
1.6.5. Οξειδάση της ξανθίνης και οξειδωτικό στρες.....	30
1.6.6. Αναστολείς οξειδάσης της ξανθίνης.....	30
1.7. Σκοπός.....	32
1.8. Ελληνικά ψυχανθή της οικογένειας <i>Leguminosae</i> .....	33
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>35</b>
2.1 Υλικά.....	35
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια.....	35

2.1.2 Εκχυλίσματα ελληνικών ψυχανθών, κλάσματα και καθαρά μόρια που απομονώθηκαν από κάποια από αυτά.....	35
2.2. Μέθοδοι.....	36
2.2.1. Αρχή της μεθόδου.....	36
2.2.1.α. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης υποστρώματος στην οποία το ένζυμο βρίσκεται σε κορεσμό.....	36
2.2.2. Επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων και κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από τα εκχυλίσματα στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης....	38
2.2.3. Υπολογισμός αναστολής - IC <sub>50</sub> .....	39
2.2.4. Στατιστική ανάλυση.....	39
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>40</b>
3.1. Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης.....	40
3.2. Επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης.....	42
3.3. Επίδραση των κλασμάτων-μειγμάτων φλαβονοειδών στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης.....	43
3.4. Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης.....	44
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>46</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>51</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>53</b>

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

**Εικόνα 1:** Φυμάτια σε ρίζα ψυχανθούς.

**Εικόνα 2:** Άνθος ψυχανθούς.

**Εικόνα 3:** Όσπρια, οι καρποί των ψυχανθών.

**Εικόνα 4:** Η πυραμίδα της παραδοσιακής Μεσογειακής διατροφής.

**Εικόνα 5:** Χημική δομή των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών οξέων (Manach C. et al. 2004).

**Εικόνα 6:** Βιοσύνθεση φλαβονοειδών (Carlo G.D. et al., 1999).

**Εικόνα 7:** Χημική δομή φλαβονοειδών (Manach C. et al., 2004).

**Εικόνα 8:** Χημική δομή των φυτικών λιγνανίων, ματαιρεσινόλη και σεκοϊσολαρισιρεσινόλη και τα ζωικά παράγωγά τους εντεροδιόλη και εντερολακτόνη (Webb A. and McCullough M., 2005).

**Εικόνα 9:** Χημική δομή της ρεσβερατρόλης (Manach C. et al., 2004).

**Εικόνα 10:** Ελεύθερη ρίζα.

**Εικόνα 11:** Ενδογενείς και εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών

**Εικόνα 12 :** Παραγωγή ROS στο μιτοχόνδριο.

**Εικόνα 13 :** Μηχανισμός μεταβολισμού ξеноβιοτικής ουσίας και παραγωγή ελευθέρων ριζών.

**Εικόνα 14:** Οι ελεύθερες ρίζες έχουν θετικές και αρνητικές επιπτώσεις (πράσινο πλαίσιο). Παραγωγή ROS (μπλε πλαίσιο), αντιοξειδωτικά μόρια (κόκκινο πλαίσιο) (Gabi N. Cellscience 2004).

**Εικόνα 15:** Διαταραχή στην ισορροπία ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών προκαλεί οξειδωτικό στρες.

**Εικόνα 16:** Εξουδετέρωση μίας ελεύθερης ρίζας από ένα αντιοξειδωτικό.

**Εικόνα 17:** Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών έναντι των ελευθέρων ριζών (Bahorun et al., 2006).

**Εικόνα 18:** Δομή Οξειδάση της ξανθίνης.

**Εικόνα 19:** Μηχανισμός δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης.

**Εικόνα 20:** Η αλλοπουρινόλη αναστέλλει την δράση της οξειδάσης της ξανθίνης.



### ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

**Πίνακας 1:** Κατηγορίες πολυφαινολών (Vermerris W. & Nicholson R., 2006).

**Πίνακας 2:** Ευεργετικές επιδράσεις φλαβονοειδών στον άνθρωπο (G. Di Carlo et al., 1999).

**Πίνακας 3:** Πηγές τροφίμων πλούσιες σε φλαβονοειδή (G. Di Carlo et al., 1999).

**Πίνακας 4:** Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS).

**Πίνακας 5:** Ο τρόπος αναστολής κι οι ουσίες των φλαβονοειδών που προκαλούν αναστολή στην οξειδάση της ξανθίνης.

**Πίνακας 6:** Υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας *Leguminosae*.

**Πίνακας 7:** Κλάσματα-μείγματα φλαβονοειδών από τα φυτά *Vicia faba* και κλάσματα καθαρών μορίων *Lotus edulis*.

**Πίνακας 8:** Πίνακας ποσοτήτων για την εύρεση της μέγιστης ταχύτητας.

**Πίνακας 9:** Επιλογή συγκέντρωσης ξανθίνης η οποία προκαλεί μέγιστη ταχύτητα.

**Πίνακας 10:** Πίνακας ποσοτήτων για την εύρεση επίδρασης των εκχυλισμάτων στην οξειδάση της ξανθίνης.

**Πίνακας 11:** Δοσοεξαρτώμενη αναστολή των υδατικών εκχυλισμάτων.

**Πίνακας 12:** Δοσοεξαρτώμενη αναστολή των μεθανολικών εκχυλισμάτων.

**Πίνακας 13:** Δοσοεξαρτώμενη αναστολή των κλασμάτων-μειγμάτων φλαβονοειδών.

**Πίνακας 14:** Δοσοεξαρτώμενη αναστολή των κλασμάτων καθαρών μορίων.

### ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

**Διάγραμμα 1:** Καμπύλη κορεσμού της οξειδάσης της ξανθίνης.

**Διάγραμμα 2:** Συγκεντρώσεις υδατικών εκχυλισμάτων που προκαλούν IC<sub>50</sub> στην οξειδάση της ξανθίνης.

**Διάγραμμα 3:** Συγκεντρώσεις μεθανολικών εκχυλισμάτων που προκαλούν IC<sub>50</sub> στην οξειδάση της ξανθίνης.

**Διάγραμμα 4:** Συγκεντρώσεις κλασμάτων-μειγμάτων φλαβονοειδών που προκαλούν IC<sub>50</sub> στην οξειδάση της ξανθίνης.

**Διάγραμμα 5:** Συγκεντρώσεις κλασμάτων καθαρών μορίων και αλλοπουρινόλης που προκαλούν IC<sub>50</sub> στην οξειδάση της ξανθίνης.

### ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

NO<sup>•</sup>: ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: ανιόν του σούπεροξειδίου

OH<sup>•</sup>: ρίζα του υδροξυλίου

RO<sup>•</sup>: ρίζα του αλκοξυλίου

ROO<sup>•</sup>: ρίζα του υπεροξυλίου

ROS/RNS: reactive oxygen species/reactive nitrogen species (δραστικές μορφές οξυγόνου/δραστικές αζωτούχες ενώσεις)

CAT: καταλάση

SOD: υπεροξειδική δισμουτάση

GPX: υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

GSH: ανηγμένης γλουταθειόνης

GSSG: γλουταθειόνη οξειδωμένη



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι καρποί των ψυχανθών, τα όσπρια, καταναλώνονται ως τρόφιμα και αποτελούν σημαντικό τμήμα της ελληνικής και Μεσογειακής διατροφής. Τα όσπρια εκτός του ότι έχουν υψηλή διατροφική αξία ως πηγή πρωτεϊνών, περιέχουν και αρκετές φυτοχημικές ουσίες, σημαντικότερη κατηγορία των οποίων αποτελούν οι πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες, έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν σημαντικές αντιϊκές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες ενώ παράλληλα δρουν αντιοξειδωτικά. Επίσης, σε προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες έχουν επίδραση στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Στα πλαίσια της μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων ελληνικών ψυχανθών πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν διάφορα φυτικά εκχυλίσματα (υδατικά και μεθανολικά) και κλάσματα πολυφαινολών, που προέρχονται από διάφορα ελληνικά ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae* που καλλιεργούνται σε όλη την Ελλάδα. Σε προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα αυτά και κλάσματα που απομονώθηκαν από αυτά παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παρατήρηση της επίδρασης αυτών των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων, πλούσιων σε πολυφαινολικές ενώσεις, στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης παίζει σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό των πουρινών και κατά την διάρκεια της άσκησης καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη καθώς και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, με παράλληλη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Συνολικά μελετήθηκαν 17 υδατικά και 17 μεθανολικά εκχυλίσματα ψυχανθών καθώς και 10 κλάσματα μειγμάτων φλαβονοειδών που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Vicia faba* και 4 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis*. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι τόσο υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα όσο και τα κλάσματα μειγμάτων φλαβονοειδών και τα καθαρά μόρια επηρέασαν την δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Η ικανότητα τους να επιδρούν στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης τα καθιστά πιθανά αντιοξειδωτικά. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη το διπλό ρόλο του ενζύμου (αναστολή της παραγωγής ελευθέρων ριζών και ουρικού οξέος), η χορήγηση των μορίων που μελετήθηκαν πριν την άσκηση χρήζει περαιτέρω μελέτης.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Ψυχανθή

Τα ψυχανθή είναι φυτά της οικογένειας των δικοτυλήδονων, της τάξης των χεδρωπών, εντάσσονται στην οικογένεια των *Leguminosae* και περιλαμβάνουν περισσότερα από 18.000 είδη που ταξινομούνται σε 650 γένη (Duranti M., 2006). Η οικογένεια των *Leguminosae* ανήκει σε μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες ανθοφόρων φυτών και ταξινομείται σε τρεις υποοικογένειες: τη *Mimosoidae*, τη *Caesalpinioideae* και τη *Faboidae* (Kurlovich & Repyev 1995). Φυτρώνουν σ' όλα σχεδόν τα μέρη του κόσμου και ονομάστηκαν "ψυχανθή", γιατί το άνθος τους μοιάζει με πεταλούδα .

Στα ψυχανθή παρατηρείται συμβιωτική διαβίωση των βακτηρίων *Rhizobium* που διαθέτουν την ικανότητα να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο. Τα βακτήρια εντοπίζονται στο ριζικό σύστημα των ψυχανθών σε ειδικά εξογκώματα που ονομάζονται *φυμάτια* (Εικόνα 1). Τα *Rhizobium* δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό μοριακό άζωτο και το μετατρέπουν σε νιτρικά ιόντα, μορφή αζώτου που μπορούν να απορροφήσουν τα ψυχανθή (Παπακώστα-Τασοπούλου Δ. 2005).



**Εικόνα 1:** Φυμάτια σε ρίζα ψυχανθούς.

Τα ψυχανθή έχουν τη μορφή μικρών ποωδών θάμνων και δέντρων. Η ζωή τους διαρκεί από ένα έως τρία έτη. Διαθέτουν ισχυρό πασσαλώδες ριζικό σύστημα με πολυάριθμες διακλαδώσεις. Τα δύο πρώτα πραγματικά φύλλα είναι συνήθως απλά, εκφύονται αντίθετα στον πρώτο κόμβο του βλαστού, ενώ τα υπόλοιπα φύλλα είναι σύνθετα κατ' εναλλαγή. Τα φύλλα αποτελούνται από τρία ή περισσότερα φυλλάρια περιττόληκτα ή αρτιόληκτα, που διαφέρουν σε υφή, σχήμα αριθμό και μέγεθος ανάλογα με το είδος και την ποικιλία. Στη βάση του σύνθετου φύλλου διακρίνεται ένα ζευγάρι μικρότερων φυλλαρίων που ονομάζονται παράφυλλα τα οποία ποικίλουν σε σχήμα και μέγεθος. Οι ταξιανθίες είναι επάκριες ή μασχαλιαίες και τα άνθη τους είναι διατεταγμένα σε κεφαλές ή βότρυς. Τα άνθη τους είναι ερμαφρόδιτα, περιλαμβάνουν ένα σωληνοειδή κάλυκα που καταλήγει σε πέντε

ανισομήκη ή σχεδόν ισομήκη δόντια και στεφάνη που αποτελείται από πέντε πέταλα τριών διαφορετικών ειδών (Εικόνα 2). Το μεγαλύτερο είναι ο πέτασος, δύο όμοια μεταξύ τους, ελεύθερα το ένα από το άλλο που ονομάζονται πτέρυγες και δύο ενωμένα μεταξύ τους πέταλα που αποτελούν την τρόπιδα. Στο εσωτερικό της τρόπιδας βρίσκονται δέκα στήμονες των οποίων τα νήματα μπορεί να είναι ενωμένα μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα σωλήνα που περιβάλλει τον ύπερο ή ο ένας να είναι ελεύθερος και οι εννέα ενωμένοι. Ο καρπός τους είναι δίβολβος, ξερός και περιέχει πολλά σπέρματα ([www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)).



Εικόνα 2: Άνθος ψυχανθούς.

Τα ψυχανθή ανεξάρτητα από το είδος τους είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, κάλιο, φολικό οξύ, φώσφορο, αλκαλικές βάσεις, σίδηρο και μαγνήσιο και είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Παράλληλα είναι και από τα πιο φτηνά, προϊόντα γιατί η καλλιέργειά τους είναι εύκολη και έρχονται δεύτερα στην παγκόσμια παραγωγή αγροτικών προϊόντων. Τα ψυχανθή εξαιτίας της ιδιότητάς τους ν' αποθηκεύουν στις ρίζες τους άζωτο, χρησιμοποιούνται συχνά σαν λιπαντικό του εδάφους. Σαν ζωοτροφή, είναι εξίσου θρεπτική (Παπακώστα-Τασοπούλου Δ. 2005). Επίσης, χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική, τις βιομηχανίες υφαντουργίας, την ανθοκομία, την ξυλουργική, ως χρωστικές ουσίες και ως καλλωπιστικά διακοσμητικά φυτά (Duranti M., 2006).

#### *1.1.1. Σημασία των ψυχανθών στην διατροφή*

Οι καρποί των ψυχανθών ονομάζονται όσπρια (Εικόνα 3) και τα edώδιμα που καλλιεργούνται συνήθως είναι τα κουκιά, τα φασόλια, η φακή, τα ρεβίθια, τα μπιζέλια, η σόγια και η φάβα. Τα όσπρια, εκτός του ότι αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεϊνών, περιέχουν και διάφορες **φυτοχημικές** ουσίες όπως η σημαντική κατηγορία των **πολυφαινολών** με ποικίλες θετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και τη θεραπεία ασθενειών όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο διαβήτης τύπου II, παθήσεις του γαστρεντερικού σωλήνα, η παχυσαρκία κ.ά. (Duranti M., 2006).





**Εικόνα 3:** Όσπρια, οι καρποί των ψυχανθών.

Τα όσπρια αποτελούν βασικό τμήμα της Μεσογειακής διατροφής. Η Μεσογειακή διατροφή χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση λαχανικών, όσπριων, φρούτων, δημητριακών, ελαιόλαδου, συχνή κατανάλωση ψαριών, μέτρια κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων και χαμηλή κατανάλωση κρέατος. Η Μεσογειακή διατροφή είναι υψηλή σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχονται στο παρθένο ελαιόλαδο και χαμηλή σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχονται στο κρέας και στα ζωικά προϊόντα (Εικόνα 4). Επίσης, χαρακτηρίζεται από υψηλό περιεχόμενο σε φυτικές ίνες, βιταμίνες, ανόργανα και φυσικά αντιοξειδωτικά. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι ο συνδυασμός των ουσιών που περιέχονται στη Μεσογειακή διατροφή φαίνεται να είναι καλή πηγή αντιοξειδωτικών και παρέχουν χημειοπροστασία τόσο στις στεφανιαίες καρδιακές παθήσεις όσο και στον καρκίνο (Vasilopoulou E. et al., 2005).



**Εικόνα 4:** Η πυραμίδα της παραδοσιακής Μεσογειακής διατροφής.

## 1.2. Πολυφαινόλες

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά. Οι πολυφαινόλες είναι φυτικές ουσίες και συμβάλλουν στην αύξηση, την ανάπτυξη και την άμυνα του φυτικού οργανισμού. Είναι χρωστικές και γευστικές ουσίες, σηματοδοτικά μόρια, ενώσεις που μπορούν να προστατεύσουν το φυτό από έντομα, μύκητες, βακτήρια και ιούς καθώς και από το στρες και την υπερϊώδη ακτινοβολία. Οι περισσότερες πολυφαινόλες εμφανίζονται στη φύση με τη μορφή εστέρων ή γλυκοζιτών παρά ως ελεύθερες ενώσεις. Οι γνωστές πολυφαινόλες υπολογίζονται σήμερα σε περισσότερες από 8.000 (Vermerris W. & Nicholson R., 2006).

Ο όρος «πολυφαινόλες» καλύπτει μια μεγάλη ομάδα χημικών ενώσεων. Βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ο *αρωματικός δακτύλιος του βενζολίου* στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Η φαινυλαλανίνη που παράγεται στα φυτά μέσω του σικιμικού οξέος αποτελεί κοινή πρόδρομη ένωση για την σύνθεση των περισσότερων πολυφαινολών (Ilja CW Arts et al., 2005). Οι ενώσεις αυτές μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τον αριθμό ανθράκων που έχουν στο μόριό τους δηλ. με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων και τις δομικές ομάδες που προσδένονται σε αυτούς (Harborne & Simmonds, 1964).

Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες, που προσλαμβάνονται μέσα από τις τροφές, συμβάλλουν στην πρόληψη διάφορων ασθενειών που συνδέονται με το οξειδωτικό stress, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Manach C. et al., 2004). Οι κύριες διαιτητικές πηγές τους είναι τα φρούτα, οι χυμοί φρούτων, το τσάι, ο καφές, και το κόκκινο κρασί. Τα λαχανικά, τα δημητριακά, η σοκολάτα, το ελαιόλαδο και τα όσπρια συμβάλλουν επίσης στη διατροφική πρόσληψη πολυφαινολών (Scalbert A., 2005).

Οι κυριότερες πολυφαινόλες είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα λιγνάνια, τα στυλβένια, οι ταννίνες, η κουμαρίνη και το κινναμικό οξύ. (Πίνακας 1) (Manach C. et al., 2004, Vermerris W. & Nicholson R., 2006).

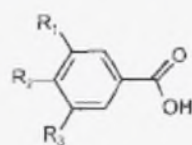
**Πίνακας 1:** Κατηγορίες πολυφαινολών (Vermerris W. & Nicholson R., 2006).

Structure	Class
C <sub>6</sub>	simple phenolics
C <sub>6</sub> - C <sub>1</sub>	phenolic acids and related compounds
C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub>	acetophenones and phenylacetic acids
C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub>	cinnamic acids, cinnamyl aldehydes, cinnamyl alcohols
C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub>	coumarins, isocoumarins, and chromones
C <sub>15</sub>	chalcones, aurones, dihydrochalcones
C <sub>15</sub>	flavans
C <sub>15</sub>	flavones
C <sub>15</sub>	flavanones
C <sub>15</sub>	flavanonols
C <sub>15</sub>	anthocyanidins
C <sub>15</sub>	anthocyanins
C <sub>30</sub>	biflavonyls
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> , C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	benzophenones, xanthenes, stilbenes
C <sub>6</sub> , C <sub>10</sub> , C <sub>14</sub>	quinones
C <sub>18</sub>	betacyanins
Lignans, neolignans	dimers or oligomers
Lignin	polymers
Tannins	oligomers or polymers
Phlobaphenes	polymers

### 1.2.1. Φαινολικά οξέα

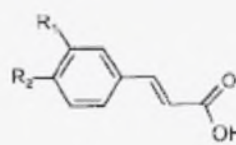
Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται στα υδροξυβενζοϊκά και στα υδροξυκινναμικά οξέα. Κάθε ένα από τα οξέα χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας διαφορετικής καρβοξυλικής ομάδας. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα που βρίσκονται με την μορφή εστέρων περιλαμβάνουν το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, το σιριγγικό οξύ, και το βανιλικό οξύ. Αυτά συναντώνται κυρίως στα κόκκινα φρούτα, στο σκουρόχρωμο ραδίκι, τα κρεμμύδια και το τσάι. Τα υδροξυκινναμικά οξέα που βρίσκονται με την μορφή γλυκοσιδίων περιλαμβάνουν το p-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ (Εικόνα 5). Αυτά συναντώνται κυρίως στη φλούδα των ώριμων φρούτων και σε φρούτα με όξινο περιβάλλον (Manach C. et al., 2004, Vermerris W. and Nicholson R., 2006).

#### Hydroxybenzoic acids



$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$  : Protocatechuic acid  
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$  : Gallic acid

#### Hydroxycinnamic acids



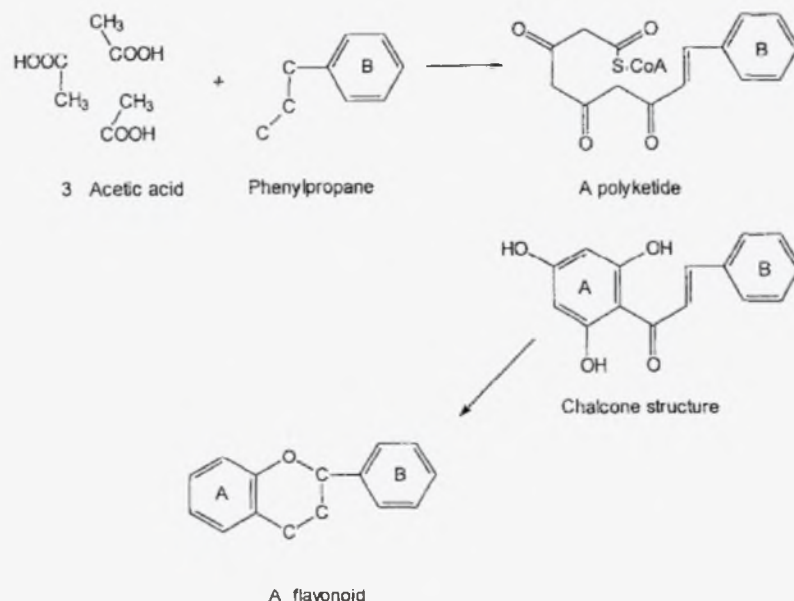
$R_1 = OH$  : Coumaric acid  
 $R_1 = R_2 = OH$  : Caffeic acid  
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$  : Ferulic acid

**Εικόνα 5:** Χημική δομή των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών οξέων (Manach C. et al. 2004).



### 1.2.2. Φλαβονοειδή

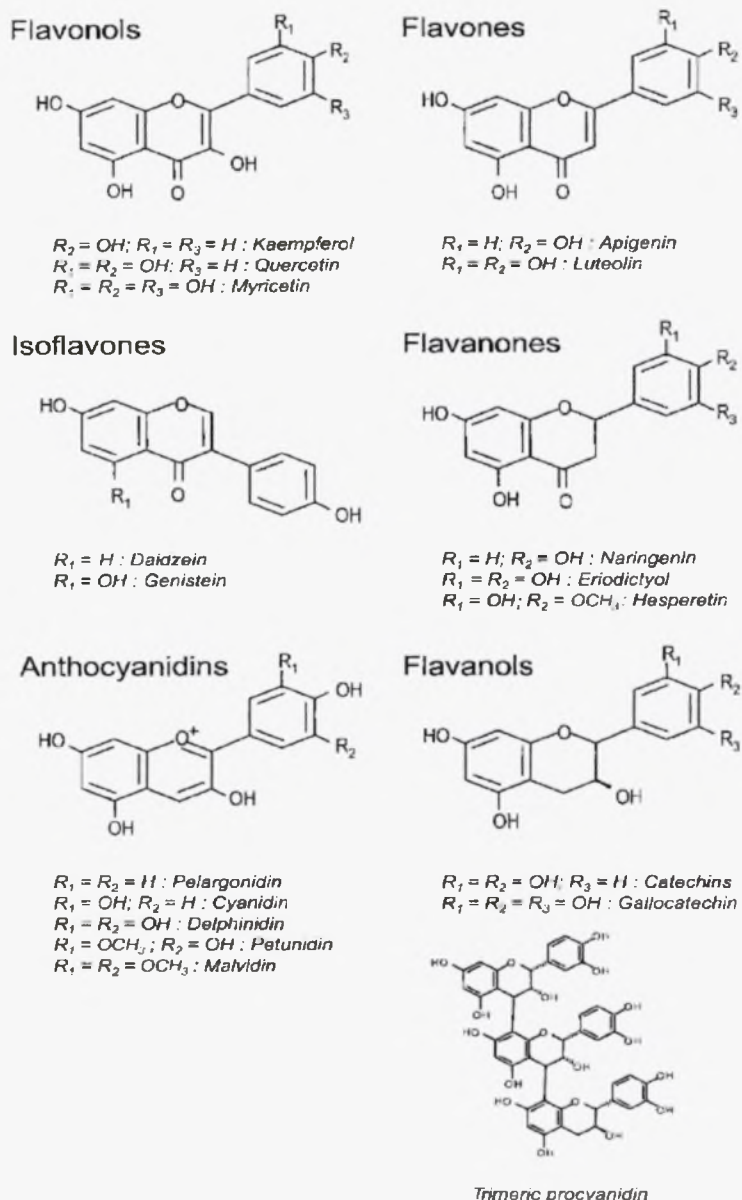
Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια μεγάλη ομάδα περίπου 4.000 ενώσεων. Η βασική και πρόδρομη ένωση των φλαβονοειδών είναι ένα φαινυλοπροπάνιο, το οποίο παράγεται από την σύνδεση τριών μορίων οξικού οξέος (Εικόνα 6). Τα φλαβονοειδή εντοπίζονται σε μεγάλες ποσότητες σε αγγειώδη φυτά και βρίσκονται συνήθως σε γλυκοζυλιωμένη μορφή. Έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν αντιϊκές, αντιαλλεργικές, αντιοστεοπορωτικές, αντιγαστρεντερικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες ενώ παράλληλα δρουν χημειοπροστατευτικά (Πίνακας 2) (Carlo G.D. et al., 1999). Τα φλαβονοειδή ανάλογα με τον υποκαταστάτη που βρίσκεται στον πυρονικό δακτύλιο διακρίνονται στις φλαβονόλες, στις φλαβόνες, στις ισοφλαβόνες, στις φλαβανόνες και στις ανθοκυανιδίνες (Εικόνα 7) (Manach C. et al., 2004).



**Εικόνα 6:** Βιοσύνθεση φλαβονοειδών (Carlo G.D. et al., 1999).

**Πίνακας 2:** Ενεργητικές επιδράσεις φλαβονοειδών στον άνθρωπο (Carlo G.D. et al., 1999).

<b>Analgesic</b>		<b>Antiinflammatory</b>	
Hesperidin	(67)	Apigenin	(25, 63)
		Chrysin	(25)
<b>Antiallergic</b>		Gossypin	(64)
Khellin	(5)	Hibritolin	(64)
Quercetin	(44)	Hypolaetin-8-β-	
		D glucoside	(64)
<b>Antianginous</b>		Luteolin	(63)
Isoflavone	(33)	Myricetin	(25)
		Nepetin	(62)
<b>Antiatherogenic</b>		Quercetin	(25, 65)
Quercetin	(85)	Quercitrin	(65, 66)
		Sideroflavanone	(64)
<b>Anticancer</b>		<b>Antiosteoporotic</b>	
Baicalein	(50)	Ipriflavone	(15, 45, 46)
Catechin	(17)		
Epigallocatechin	(51)	<b>Antispasmodic</b>	
Kaempferol-3-O-β-D-		Apigenin	(22, 23)
glucopiranoside	(60)	Catechin	(22)
Nobiletin	(48)	Chrysin	(22, 23)
Quercetin	(18, 51, 53, 58)	Flavone	(22, 23)
Rutin	(18)	Kaempferol	(22)
Tangeretin	(49)	Quercetin	(22, 23)
Tricin	(60)		
Wogonin	(50)	<b>Antiulcer</b>	
		Flavanone	(74)
<b>Antidiabetic</b>		Flavone	(74)
Quercetin	(1)	Hypolaetin-8-	
		glucoside	(69, 70)
<b>Antidiarrhoeal</b>		Kaempferol	(73)
Apigenin	(24)	Quercetin	(73, 74)
Flavone	(24)	Rutin	(73)
Kaempferol	(24)	Solon	(68)
Morin	(24)		
Myricetin	(24)	<b>Vascular protection</b>	
Naringenin	(24)	Anthocyanidins	(31)
Quercetin	(24, 84)	Citrin	(28)
Quercitrin	(80, 81)	Rutoside	(29)
<b>Antihepatotoxic</b>			
Gossypin	(38)		
Hispidulin	(16)		
Hydroxyethylrutoside	(38)		
Kolaviron	(35)		
Quercetin	(42)		
Silymarin	(34, 36, 37)		



Εικόνα 7: Χημική δομή φλαβονοειδών (Manach C. et al., 2004).

Οι **φλαβονόλες** είναι ευρέως διαδεδομένα φλαβονοειδή και οι κυριότεροι εκπρόσωποί τους είναι η κερκετίνη, η μυρικετίνη και η καιμπφερόλη. Βρίσκονται συνήθως σε γλυκοσυλιωμένη μορφή και εμφανίζονται στα εξωτερικά μέρη του φυτού (φλούδα και φύλλα) επειδή η βιοσύνθεσή τους επάγεται από το φως. (Manach C. et al., 2004).

Οι **φλαβόνες** είναι λιγότερο διαδεδομένες από τις φλαβονόλες και οι κυριότεροι εκπρόσωποί τους είναι η λουτεολίνη και η απιγενίνη, οι οποίες βρίσκονται σε γλυκοσίδια (Manach C. et al., 2004).

Οι **ισοφλαβόνες** έχουν ως κυριότερους εκπροσώπους τη γενιστεΐνη και την ντεντζεΐνη. Οι ισοφλαβόνες αν και δεν είναι στεροειδή, χαρακτηρίζονται ως φυτοοιστρογόνα. Εμφανίζουν δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα και θεωρούνται

ψευδορμόνες καθώς έχουν την ιδιότητα να δεσμεύονται από τους υποδοχείς των οιστρογόνων. Επίσης, έχουν OH-ομάδες στις θέσεις C7 και C4' σε ανάλογη διαμόρφωση με αυτή που περιέχεται στην οιστραδιόλη (Manach C. et al. 2004).

Οι **φλαβανόνες** έχουν ως κυριότερους εκπροσώπους την εσπερετίνη και τη ναριγενίνη, οι οποίες είναι γλυκοσυλιωμένες με ένα δισακχαρίδιο στη θέση C7 (Manach C. et al., 2004).

Οι **ανθοκυανίνες** με κυριότερο εκπρόσωπο την κυανιδίνη, είναι χρωστικές ουσίες των φυτών και εντοπίζονται τόσο στον επιδερμικό ιστό όσο και στην σάρκα των καρπών. Σ' αυτές οφείλεται το ροζ, κόκκινο, μπλε και πορφυρό χρώμα των λουλουδιών. Οι ανθοκυανίνες μέσα στα φυτά είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές στο φως, το pH και την οξείδωση λόγω της γλυκοσυλίωσης και εστεροποίησης των δομών τους με διάφορα οργανικά και φαινολικά οξέα (Manach C. et al., 2004).

Οι **φλαβανόλες** έχουν ως κυριότερους εκπροσώπους την κατεχίνη, την επικατεχίνη και την επιγαλλοκατεχίνη. Συγκεκριμένα, οι κατεχίνες βρίσκονται σε μονομερή μορφή ενώ τα πολυμερή παράγωγά τους είναι οι προανθοκυανιδίνες, οι οποίες είναι γνωστές ως συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι φλαβανόλες δεν εμφανίζονται σε γλυκοσυλιωμένες μορφές (Manach C. et al., 2004).

Τα φλαβονοειδή με τις μορφές που αναφέρθηκαν παραπάνω ανιχνεύονται σε ένα ευρύ φάσμα φυτικών οργανισμών. Έχει αποδειχθεί ότι έχουν ευεργετικές επιδράσεις στον άνθρωπο και είναι απαραίτητα συστατικά στη διατροφή του (Πίνακα 3) (Carlo G.D. et al., 1999).

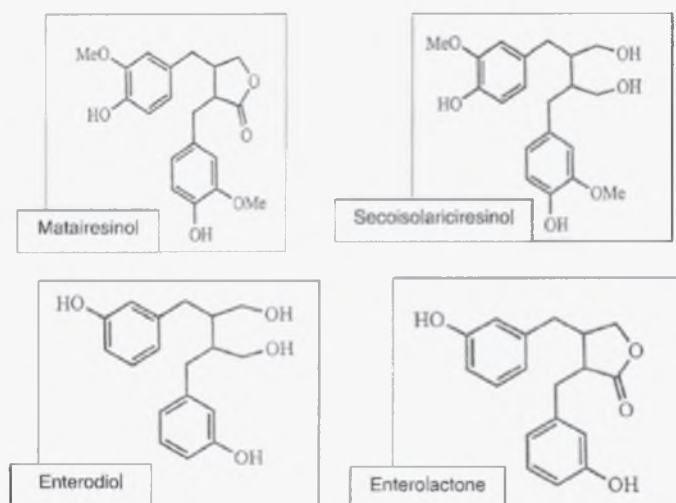
**Πίνακας 3:** Πηγές τροφίμων πλούσιες σε φλαβονοειδή (Carlo G.D. et al., 1999).

Some Natural Sources of Flavonoids	
Flavonoid	Source: dietary products and medicinal plants
<b>Flavones</b>	
Apigenin	<i>Persea latifolia</i> , <i>Asium graveolens</i>
<b>Flavone glycosides</b>	
Baicalin	<i>Scutellaria baicalensis</i>
<b>Flavonols</b>	
Quercetin	<i>Allium cepa</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Vaccinium macrocarpon</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>Olea europaea</i> , <i>Thea sinensis</i> , <i>Crataegus cuneata</i> , <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Pueraria thumbergia</i> , <i>Morus alba</i>
Kaempferol	<i>Cichorea endivia</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>Thea sinensis</i> , <i>Raphanus sativus</i>
Myricetin	<i>Vaccinium macrocarpon</i> , <i>Thea sinensis</i> , <i>Vitis vinifera</i>
<b>Flavonol glycosides</b>	
Rutin	<i>Sophora japonica</i> , <i>Fagopyrum esculentum</i> , <i>Eucalyptus macrocarpa</i> , <i>Stellaria media</i>
<b>Flavan-3-ol</b>	
Catechin	<i>Thea sinensis</i> , <i>Vitis vinifera</i>
<b>Flavanones</b>	
Naringenin	<i>Eucalyptus globulus</i>
<b>Flavanonols</b>	
Taxifolin	Citrus fruits sp. ( <i>aurantium</i> , <i>limon</i> , etc.)
<b>Isoflavones</b>	
Genistein	<i>Soya hispida</i> , <i>Stellaria media</i> , <i>Pueraria lobata</i> , <i>Sophora japonica</i>

From Rich-Evans modified (7)

### 1.2.3. Λιγνάνια

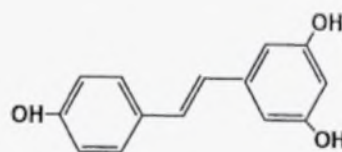
Τα λιγνάνια αποτελούνται από δυο μόρια φαινυλοπροπανίου. Έχουν ως κυριότερους εκπροσώπους την σεκοϊσολαρισιρεσινόλη και την ματαιρεσινόλη που εντοπίζονται κυρίως στο λιναρόσπορο και σε μικρότερες ποσότητες στα ψυχανθή, τα δημητριακά, τα φρούτα, τα λαχανικά, τις φτέρες, τα γυμνόσπερμα και τα αγγειόσπερμα. Η θέση τους πάνω στο φυτό είναι στα ξυλώδη στελέχη καθώς και μέσα σε σπόρια. Τα φυτικά λιγνάνια μεταβολίζονται από την εντερική μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου σε εντεροδιόλη και εντερολακτόνη (Εικόνα 8). Τα λιγνάνια έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν θεραπευτικές ιδιότητες σε πολλές ασθένειες (Manach C. et al., 2004, Vermerris W. and Nicholson R., 2006).



**Εικόνα 8:** Χημική δομή των φυτικών λιγνανίων, ματαιρεσινόλη και σεκοΐσολαρισιρεσινόλη και τα ζωικά παράγωγά τους εντεροδιόλη και εντερολακτόν (Webb A. and McCullough M., 2005).

#### 1.2.4. Στιλβένια

Τα στιλβένια αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα αιθενίου (Εικόνα 9). Το πιο γνωστό στιλβένιο είναι η ρεσβερατρόλη, η οποία είναι εκτενώς μελετημένη και βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στο κόκκινο κρασί και τα σταφύλια (Manach C. et al., 2004).



**Resveratrol**

**Εικόνα 9:** Χημική δομή της ρεσβερατρόλης (Manach C. et al., 2004).



### 1.3. Ελεύθερες ρίζες

Ελεύθερη ρίζα είναι κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης, το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα (Εικόνα 10) (Halliwell B., 2001). Η διαμόρφωση αυτή είναι εξαιρετικά ασταθής και προκύπτει είτε από την απώλεια ( $X \rightarrow e^- + X^{\bullet+}$ ) είτε από την προσθήκη ( $Y + e^- \rightarrow Y^{\bullet-}$ ) ενός ηλεκτρονίου στην εξωτερική στιβάδα σθένους (Mylonas & Kouretas 1999). Όταν τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας βρίσκονται συζευγμένα έχουν αντίθετο spin (+ 1/2 και - 1/2), το μόριο διατηρείται αδρανές και κατά συνέπεια δεν είναι δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας μένουν ασύζευκτα έχουν spin προς την ίδια κατεύθυνση (+ 1/2, ή - 1/2), τότε το μόριο γίνεται ασταθές και τείνει να αντιδράσει περισσότερο με άλλα μόρια (Bulkley G., 1990). Έτσι, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν ταχύτατα με άλλα μόρια ή άλλες ελεύθερες ρίζες προκειμένου να αποκτήσουν ζεύγη ηλεκτρονίων στην εξωτερική τους στιβάδα κάτι που μπορεί να επιφέρει τόσο εξουδετέρωση όσο και δημιουργία νέων ριζών.



Εικόνα 10: Ελεύθερη ρίζα.

Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο H με ένα πρωτόνιο κι ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Στις ελεύθερες ρίζες εντάσσονται και οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), που προέρχονται από το οξυγόνο καθώς και οι ενεργές ρίζες αζώτου (reactive nitrogen species, RNS), που προέρχονται από το άζωτο. Μπορούν να παραχθούν και άλλα μόρια από παράγωγα οξυγόνου και αζώτου που δεν είναι ρίζες αλλά είναι αρκετά δραστικά (Πίνακας 4) (Halliwell B., 2001). Επίσης, τα μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, τα οποία έχουν ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα μπορούν να αντιδράσουν με υπεροξείδιο του υδρογόνου προς σχηματισμό ρίζας υδροξυλίου [γνωστή ως αντίδραση Fenton:  $Fe^{+2} (Cu^+) + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} (Cu^{+2}) + OH + OH^-$ ] (Stohs SJ, Bagchi D., 1995).

Πίνακας 4: Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) (Halliwell B., 2001).

---

**Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)**

*Ρίζες*

$O_2^{\cdot -}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $RO_2^{\cdot}$ ,  $RO^{\cdot}$ ,  $H_2O^{\cdot}$

*Μη ρίζες*

$H_2O_2$ ,  $HOCl$ ,  $HOBr$ ,  $O_3$ , Μονήρες  $O_2$

**Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)**

*Ρίζες*

$NO^{\cdot}$ ,  $NO_2^{\cdot}$

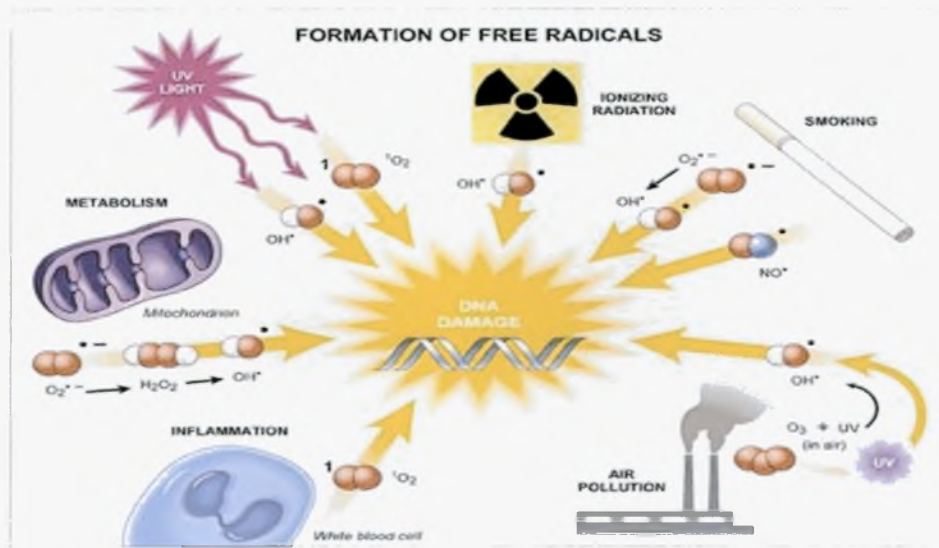
*Μη ρίζες*

$HNO_2$ ,  $NO^+ / NO^-$ ,  $N_2O_4$ ,  $N_2O_3$ ,  $ONOO^-$ ,  
 $ONOOH$ ,  $NO_2^+$ ,  $ROONO$

---

**1.3.1. Παραγωγή ελευθέρων ριζών**

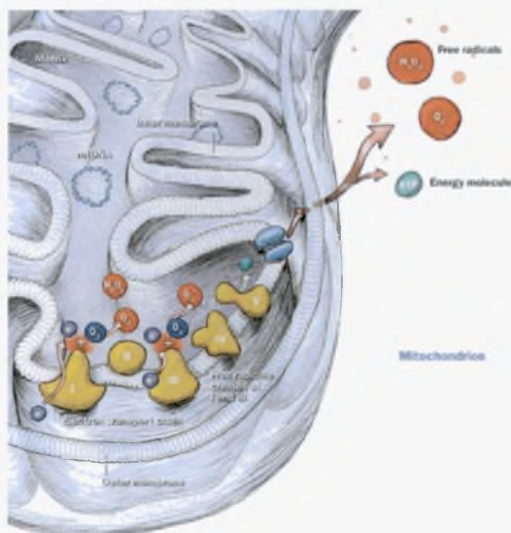
Οι πηγές των ελευθέρων ριζών μπορούν να ταξινομηθούν σε ενδογενείς και εξωγενείς (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Ενδογενείς και εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών.

**1.3.1.a. Ενδογενείς πηγές**

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποτελεί την κύρια πηγή ενδογενούς παραγωγής ROS (Di Meo & Venditti 2001). Κατά την διαδικασία της παραγωγής ATP, που λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα του μιτοχονδρίου, ηλεκτρόνια διαφεύγουν από το σύμπλοκο I και III και συνδέονται με  $O_2$  παράγοντας ROS ( $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ ) (Sjodin B. et al., 1990). Έχει βρεθεί ότι το 2-5% του οξυγόνου που χρησιμοποιείται για τον αερόβιο μεταβολισμό μετατρέπεται σε ROS (Εικόνα 12) (Boveris & Cadenas 1997).

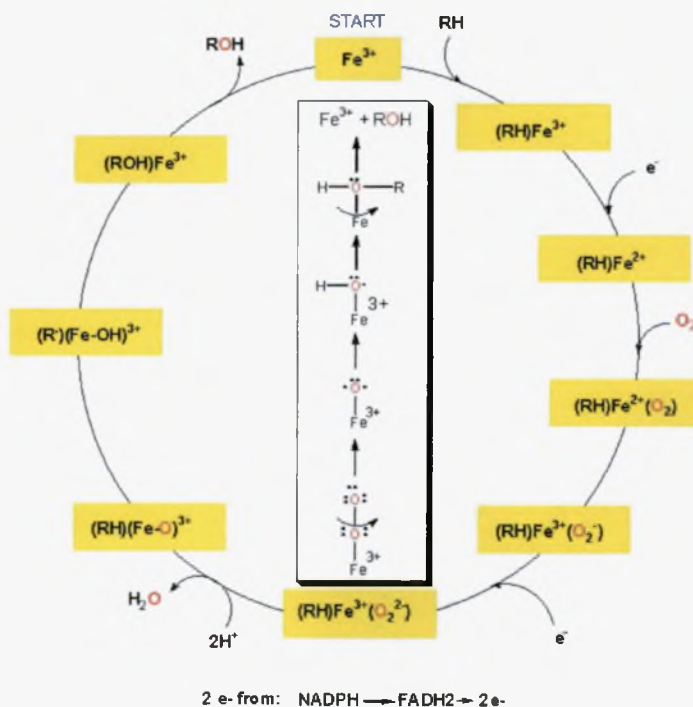


**Εικόνα 12 :** Παραγωγή ROS στο μιτοχόνδριο.

Στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύστημα του κυτοχρώματος P-450 αποτελεί μία σημαντική πηγή ελεύθερων ριζών. Σε αυτό εντοπίζεται το ενζυμικό σύστημα των μονοοξυγενασών, το οποίο εμπλέκεται στην απομάκρυνση ξενοβιοτικών (π.χ. φάρμακα, εντομοκτόνα κ.α.) μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντας το υπόστρωμα (π.χ. φάρμακο) (Εικόνα 13) (Κουρέτας Δ. 2003).



**MONOOXYGENASES: POSSIBLE MECHANISM**



**Εικόνα 13 :** Μηχανισμός μεταβολισμού ξενοβιοτικής ουσίας και παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Τα υπεροξειδισώματα είναι μικρά μεμβρανικά κυστίδια, στα οποία παράγονται ελεύθερες ρίζες. Συγκεκριμένα, μέσα στα υπεροξειδισώματα, τα λιπαρά οξέα υφίστανται μια ειδική οξειδωτική διαδικασία. Στο πρώτο στάδιο αυτής της διαδικασίας, μια φλαβοπρωτεΐνη αφαιρεί ένα ζευγάρι ατόμων υδρογόνου από ένα μόριο ενεργοποιημένου λιπαρού οξέος (acyl-Coa). Τα δυο άτομα υδρογόνου μεταφέρονται απευθείας στο μοριακό οξυγόνο και παράγεται το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Alberts B. et al., 2000).

Οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις, ιδιαίτερα οι χρόνιες, αποτελούν μία σημαντική πηγή ελεύθερων ριζών. Τα λευκοκύτταρα όπως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν έναν μεγάλο αριθμό ROS (Sebaldt R.J. et al., 1992, Klebanoff, S. J., 1988.) Ακόμη, στις ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών συγκαταλέγονται διάφορα μόρια μεταξύ των οποίων φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμοσφαιρίνη που μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) (Cutler R., 1994).

#### *1.3.1.β. Εξωγενείς πηγές*

Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών είναι αναπόφευκτη στον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ επηρεάζεται και από εξωγενείς παράγοντες.

Στους φυσικούς παράγοντες περιλαμβάνεται η ιονίζουσα και υπεριώδης ακτινοβολία, οι οποίες ευνοούν την παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω της ραδιόλυσης και της φωτόλυσης του νερού. Επίσης, η έντονη άσκηση (Inoue T. et al., 1993, Poulsen H. et al., 1993), το άγχος και οι ορμόνες, ανήκουν στους φυσικούς παράγοντες παραγωγής ελευθέρων ριζών.

Στους χημικούς παράγοντες περιλαμβάνονται η ρύπανση του περιβάλλοντος, το κάπνισμα (Suzuki J., et al., 1995, Asami. S., et al., 1996), τα εντομοκτόνα, τα φυτοφάρμακα, το αλκοόλ (Nakajima, M. et al., 1996) κ.α..

Ως βιολογικοί παράγοντες αναφέρονται η προσβολή από μικροοργανισμούς και οι διαταραχές στη θερμοκρασία και την υγρασία.

#### *1.3.2. Θετικές επιδράσεις*

Οι ελεύθερες ρίζες συμβάλλουν στη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Παράγονται από τα φαγοκύτταρα και δρουν ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης. Αυτός ο ρόλος των ελευθέρων ριζών ενισχύεται σε κατάσταση φλεγμονής (Finaud J. et al., 2006). Επίσης, οι ROS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στη μυϊκή συστολή (Linnane A.W. et al., 2002). Έχει βρεθεί ότι αναστολή της παραγωγής των ROS έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της συσταλτικότητας ορισμένων μυϊκών ινών. Αντίθετα, αύξηση των επιπέδων των ROS αυξάνει τη δύναμη συστολής των ινών. Ωστόσο, η

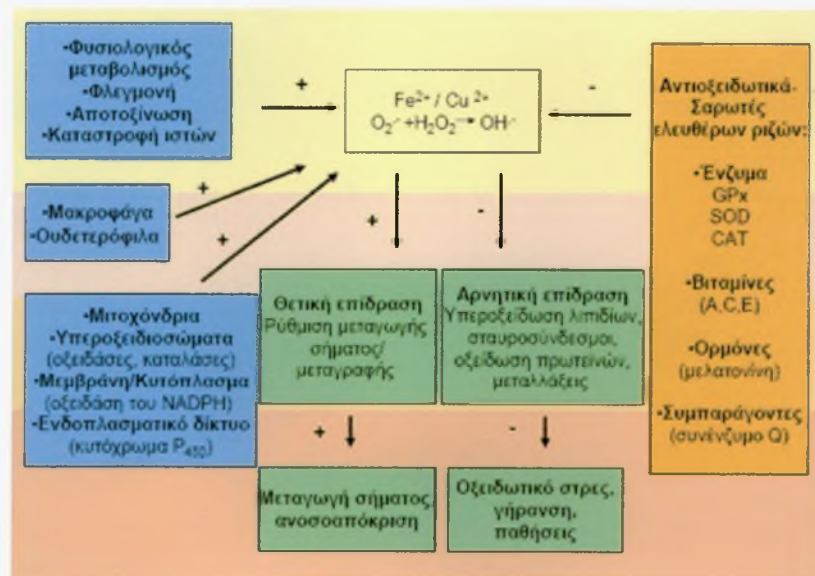


παρατεταμένη ποσότητα ROS στους μυϊκούς ιστούς σχετίζεται με την μυϊκή κόπωση (Reid M.B. et al., 1992). Μια ακόμη θετική επίδραση των ελευθέρων ριζών είναι η συμμετοχή τους ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι στα σηματοδοτικά μονοπάτια (Sen C.K. et al., 1996, Sen CK. 2001, Reid M.B., 2001). Επιπλέον, οι ROS συμβάλλουν στη ρύθμιση μοριακών μηχανισμών που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό και την απόπτωση (Hensley K. et al., 2002).

### 1.3.3. Αρνητικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν οξείδωση πρωτεϊνών, οξείδωση του DNA και υπεροξείδωση των λιπιδίων (Halliwell B., 2001). Οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται ακόμη στη διαδικασία της γήρανσης. Η γήρανση είναι μία προοδευτική διαδικασία η οποία σχετίζεται με τη συγκέντρωση ελευθέρων ριζών λόγω μιας ανισορροπίας στο σχηματισμό οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών (Gabi N. Cellscience 2004) (Εικόνα 14).

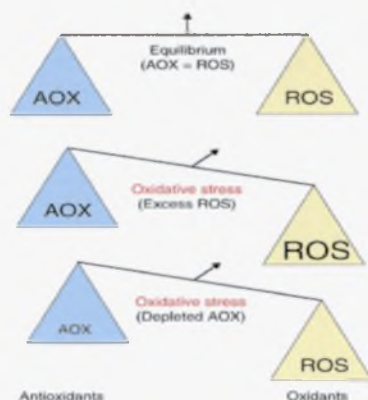
Οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται υπεύθυνες για ασθένειες και παθολογικές καταστάσεις, όπως η αρτηριοσκλήρυνση, η υπέρταση, ο καρκίνος, ο διαβήτης, ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος και διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες (όπως η νόσος του Alzheimer και του Parkinson) (Halliwell B., 2001).



**Εικόνα 14:** Οι ελεύθερες ρίζες έχουν θετικές και αρνητικές επιπτώσεις (πράσινο πλαίσιο). Παραγωγή ROS (μπλε πλαίσιο), αντιοξειδωτικά μόρια (κόκκινο πλαίσιο) (Gabi N. Cellscience 2004).

#### 1.4. Οξειδωτικό στρες

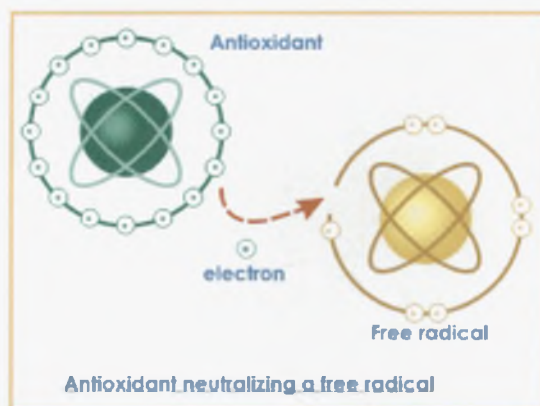
Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών υπέρ των πρώτων (Sies H., 1991). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μειωμένη λειτουργικότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, είτε από αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (Εικόνα 15) (Halliwell B., 2001).



**Εικόνα 15:** Διαταραχή στην ισορροπία ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών προκαλεί οξειδωτικό στρες.

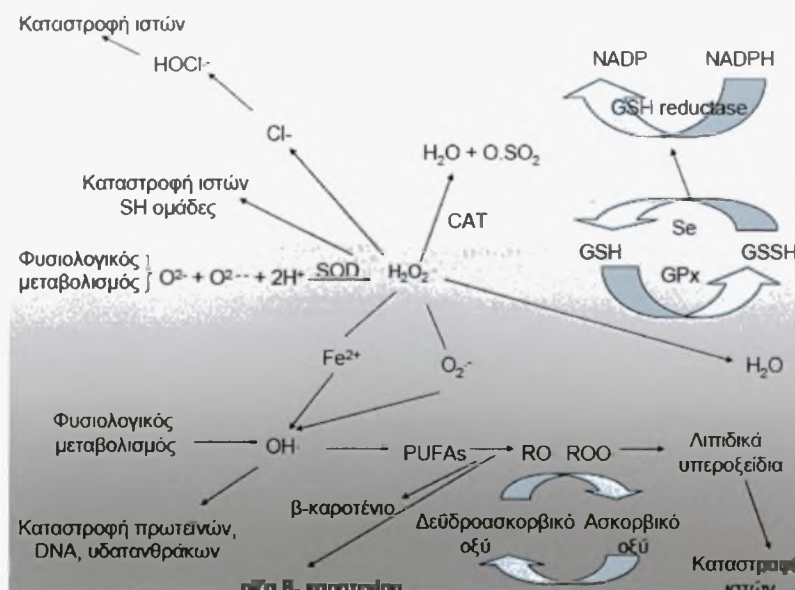
#### 1.5. Αντιοξειδωτικά

Αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιαδήποτε ουσία, η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος, επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Εικόνα 16) (Halliwell B., 2001). Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τα ενζυμικά και τα μη ενζυμικά (Εικόνα 17) (Halliwell and Gutteridge, 1998).



**Εικόνα 16:** Εξουδετέρωση μίας ελεύθερης ρίζας από ένα αντιοξειδωτικό.



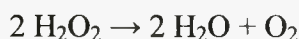


**Εικόνα 17:** Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών έναντι των ελευθέρων ριζών (Baharun et al., 2006).

### 1.5.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι ένα σημαντικό ένζυμο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού και αποτελεί την κύρια άμυνα ενάντια στα ανιόντα του σουπεροξειδίου (Mylonas & Kouretas, 1999). Καταλύει τη μετατροπή ανιόντων σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ ). Εμφανίζεται σε τρεις μορφές την κυτταροπλασματική CuZn-SOD, τη μιτοχονδριακή MnSOD και την εξωκυττάρια SOD.

Η καταλάση (CAT) είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα υπεροξεισώματα και καταλύει την αντίδραση:



Η καταλάση των θηλαστικών αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες, κάθε μία από τις οποίες περιέχει μια ομάδα αίμης (Halliwell and Gutteridge, 1998).

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) υπάρχει σε δύο μορφές, μία εκ των οποίων έχει ως συμπράγοντα το σελήνιο. Η GPX μετατρέπει τα υδροϋπεροξείδια των λιπιδίων και το  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και σταθερές αλκοόλες. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται με την ταυτόχρονη οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε οξειδωμένη γλουταθειόνη. Πρόκειται για ένζυμο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα και είναι άφθονο στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο (Nakane T. et al., 1998).

### *1.5.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά*

Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι μικρά μόρια, που μπορούν να λάβουν ή να δώσουν ηλεκτρόνιο από μια ρίζα προς σχηματισμό σταθερών παραπροϊόντων. Η αντίδραση οδηγεί σε οξείδωση του αντιοξειδωτικού, το οποίο πρέπει να αναγεννηθεί ή να αντικατασταθεί. Η αντιοξειδωτική ρίζα είναι σχετικά αδρανής και δεν μπορεί να αντιδράσει με άλλα μόρια.

#### Πολυφαινόλες

Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση καθώς λειτουργούν ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών. Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών οφείλεται στις φαινολικές τους ομάδες, οι οποίες λειτουργούν τόσο ως δέκτες ηλεκτρονίων όσο και ως δότες ατόμου H στις ελεύθερες ρίζες ( $RO^{\bullet} + PPH \rightarrow ROH + PP^{\bullet}$ ). Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται σταθερές φαινοξυλικές ρίζες οι οποίες σταματούν τις οξειδωτικές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών (Scalbert A. et al., 2005). Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα ( $Fe^{+2}$  και  $Cu^{+}$ ) παρεμποδίζοντας το σχηματισμό της ρίζας  $OH^{\bullet}$  που παράγεται από την αντίδραση Fenton. Τέλος, ορισμένες πολυφαινόλες παρατηρήθηκε ότι δρουν αντιοξειδωτικά ενισχύοντας την δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Ferguson P.L. 2001).

#### Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και υπάρχει στην ανηγμένη (GSH) και στην οξειδωμένη (GSSG) μορφή. Έχει βρεθεί ότι εξουδετερώνει άμεσα ROS συμμετέχοντας στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αναστρέψιμης οξείδωσης της ενεργού θειόλης της. Επίσης, ενισχύει τη λειτουργική αντιοξειδωτική ικανότητα των βιταμινών C και E (May J.M. et al., 1996, Groussard C. et al., 2003).

#### Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C είναι μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη, με δράση τόσο στον εξωκυττάριο χώρο όσο και στο κυτταρόπλασμα. Έχει δείχθει ότι είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό καθώς δεσμεύει το ανιόν σουπεροξειδίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, την υδροξυλική ρίζα, το υποχλωριούχο οξύ, τις υδατοδιαλυτές υπεροξυλικές ρίζες και το μονήρες οξυγόνο (Pietri S., 1994). Επίσης, λειτουργεί ως συμπάράγοντας ενζύμου ενισχύοντας τη δράση της βιταμίνης E και της GSH (Fang Y.Z. et al., 2002).

### Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή πρωτεΐνη και υπάρχει σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η τοκοφερόλη είναι η πιο δραστική μορφή της βιταμίνης E στους ανθρώπους και αποτελεί ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Η κύρια αντιοξειδωτική της δράση αφορά στην προστασία κατά της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (Gutteridge J.M., 1995).

### Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι μια ομάδα λιποδιαλυτών. Το πιο σημαντικό από αυτά είναι το β-καροτένιο και είναι δεσμευτής μονήρους οξυγόνου αντιοξειδωτικών (Cooper D.A. et al., 1999). Σημαντικός ρόλος συγκεκριμένων καροτενοειδών είναι ότι αποτελούν πρόδρομες ουσίες της βιταμίνης A (ρετινόλη), η οποία έχει επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Keys S.A. et al., 1999).

### Συνένζυμο Q

Το συνένζυμο Q (ουβικινόνη) παίζει σημαντικό ρόλο στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα και παρουσιάζει ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες (Mylonas C. and Kouretas D. 1999).

### Μεταλλοθειονίνες

Οι μεταλλοθειονίνες είναι μια ομάδα μικρών πρωτεϊνών, πλούσιων σε κυστεΐνη, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να συνδέονται με ιόντα μετάλλων. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ιδιαίτερη σημασία στην αντιμετώπιση της τοξικότητας των μετάλλων, όπως είναι ο Cu (Mylonas C. and Kouretas D., 1999).

## **1.6. Οξειδάση της ξανθίνης**

### *1.6.1. Γενικές πληροφορίες*

Το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης ανήκει στην κατηγορία των οξειδοαναγωγικών ενζύμων. Παίζει σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό των πουρινών (Harrison R., 2002, Hille R., 2006). Καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη καθώς και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο που βρίσκεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ αλλά και σε μικρότερες συγκεντρώσεις στην καρδιά, τον εγκέφαλο, τους μύες, το πάγκρεας και το έντερο. Η οξειδάση της ξανθίνης μπορεί να μετατραπεί σε αφυδρογονάση από αντιστρεπτή οξείδωση σουλφυδρυλίου ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), McCord and Fridovich, 1968).

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα ένζυμο που συνεισφέρει σημαντικά στην παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση. Χρησιμοποιεί ως δέκτη ηλεκτρονίων μοριακό οξυγόνο κατά τη διαδικασία της διάσπασης των πουρινών με αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και ανιόντος σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) (McCord and Fridovich, 1968).

### *1.6.2. Πρωτεϊνική δομή*

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι μια φλαβινοπρωτεΐνη (δεσμεύεται με  $FAD^+$ ) και έχει μοριακό βάρος 270.000 kDa (Εικόνα 18). Είναι αποένζυμο και χρησιμοποιεί ως συνένζυμο, Mo (μολυβδαίνιο) και Fe (σίδηρο) με 2 και 8 θέσεις σύνδεσης αντίστοιχα. Οι θέσεις σύνδεσης για το Mo βρίσκονται στην δραστική περιοχή του ενζύμου (ενεργό κέντρο), ενώ οι θέσεις σύνδεσης του Fe συμμετέχουν στην μεταφορά ηλεκτρονίων (Enroth C. et al., 2000).



**Εικόνα 18:** Δομή Οξειδάση της ξανθίνης.



### 1.6.3. Μηχανισμός δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα υποξανθίνη και ξανθίνη τις οποίες οξειδώνει προς σχηματισμό ξανθίνης και ουρικού οξέος, αντίστοιχα (Εικόνα 19).



**Εικόνα 19:** Μηχανισμός δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης.

Η παραπάνω αντίδραση επιτελείται με την βοήθεια του Mo που περιέχει η οξειδάση της ξανθίνης στο ενεργό της κέντρο. Και στις δύο αντιδράσεις που καταλύει η οξειδάση της ξανθίνης, ένα άτομο οξυγόνου από το μόριο του  $\text{H}_2\text{O}$  συνδέεται με το Mo και στη συνέχεια μεταφέρεται στην υποξανθίνη και την ξανθίνη προς σχηματισμό ξανθίνης και ουρικού οξέος, αντίστοιχα (Εικόνα 19). Το οξυγόνο που χρησιμοποιούν οι οξειδοαναγωγάσες μολυβδαινίου προέρχεται από το  $\text{H}_2\text{O}$  και όχι από το μοριακό οξυγόνο (Hille R., 2006).

### 1.6.3. Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Παράγεται από την ξανθίνη και την υποξανθίνη με την δράση του ενζύμου της οξειδάσης της ξανθίνης. Είναι ένα ισχυρό αναγωγικό μέσο και έχει σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς εξουδετερώνει τις ρίζες  $\text{RO}_2^\cdot$ ,  $\text{OH}^\cdot$ , το όζον, και το υποχλωριώδες οξύ. Επίσης, έχει βρεθεί ότι στο ουρικό οξύ οφείλεται τουλάχιστον το 50% της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος του αίματος και με αυτόν τον τρόπο προστατεύει τα ερυθροκύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες και το DNA (Wayner D.D. et al., 1987).

Το ουρικό οξύ μέσα στον οργανισμό, χάνει ένα πρωτόνιο σε συνθήκες φυσιολογικού pH και σχηματίζεται το ουρικό ιόν. Το ουρικό ιόν είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών και απεκκρίνεται με τα ούρα. Υψηλά επίπεδα ουρικού ιόντος στον ορό του αίματος (υπερουριχαιμία) προκαλούν ουρική αρθρίτιδα (ποδάγρα), μια ασθένεια κατά την οποία άλατα ουρικού κρυσταλλώνονται και καταστρέφουν τις αρθρώσεις και τους νεφρούς (Tausche A.K. et al., 2006). Επίσης, αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό του αίματος που συνδέονται με την άσκηση, σχετίζονται με την εμφάνιση ασθενειών όπως καρδιαγγειακές παθήσεις (Heinig M. et al., 2006), το σύνδρομο Lesch-Nyhan (Luo Y.C. et

al., 2006), ο διαβήτης (Dehghan A. et al., 2007), το μεταβολικό σύνδρομο (Nakagawa T. et al., 2006), η σκλήρυνση κατά πλάκας (Toncev G. et al., 2002).

#### *1.6.4. Οξειδάση της ξανθίνης και οξειδωτικό στρες*

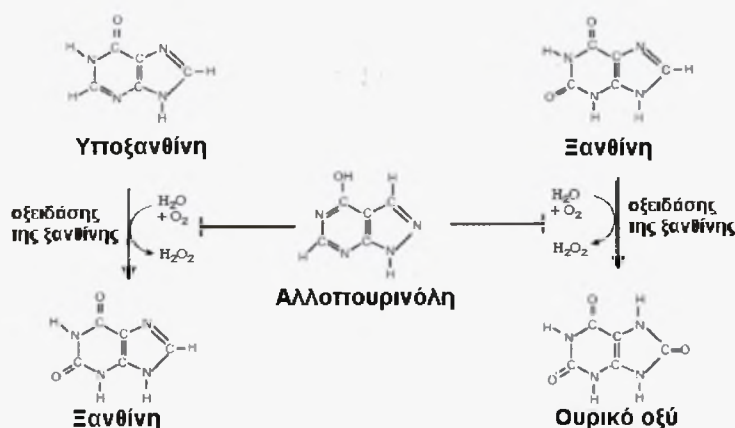
Έχει βρεθεί ότι η οξειδάση της ξανθίνης εμπλέκεται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την διάρκεια της άσκησης και συνεπώς στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Κατά τη διάρκεια της άσκησης το ATP διασπάται σε AMP και ADP λόγω των αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων. Αν η παροχή οξυγόνου είναι ανεπαρκής, τα επίπεδα του AMP αυξάνονται συνεχώς με αποτέλεσμα να ευνοείται η μετατροπή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης στην οξειδωμένη της μορφή -οξειδάση της ξανθίνης- και την αποικοδόμηση του AMP σε υποξανθίνη. Η υποξανθίνη αποτελεί το υπόστρωμα της οξειδάσης της ξανθίνης και μέσω της δράσης της μετατρέπεται σε ξανθίνη και τελικά παράγεται ουρικό οξύ και ROS. Στη συνέχεια το ουρικό οξύ διαχέεται στο εσωτερικό των μυών και λειτουργεί προστατευτικά απέναντι στην προκαλούμενη από ROS οξείδωσή τους (Hellsten Y. et al., 1997, Hellsten Y. et al., 1998).

#### *1.6.5. Αναστολείς οξειδάσης της ξανθίνης*

Οι αναστολείς του ενζύμου XO μειώνουν την παραγωγή του ουρικού οξέος και των ελευθέρων ριζών. Διακρίνονται στους αναστολείς που είναι ανάλογα πουρινών όπως αλλοπουρινόλη, οξυπουρινόλη και τισοπουρίνη (Pacher P., et al., 2006, Iwanaga T., et al., 2005) και σε άλλα μόρια όπως πολυφαινόλες. (Cotelle N. 2001, Lin JK et al., 2000, Nagao A. et al., 1999). Η καιμπφερόλη και η κερκετίνη και κάποιες γλυκοσυλιωμένες μορφές της έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (Cos P. et al., 1998). Το ένζυμο XO αποτελεί την κύρια πηγή ελευθέρων ριζών κατά την αναερόβια άσκηση (Hellsten Y. et al., 1998). Οι αναστολείς του ενζύμου XO μειώνουν την παραγόμενη ποσότητα ελευθέρων ριζών στο οργανισμό. Επίσης, οι αναστολείς του ενζύμου XO σχετίζονται με την θεραπεία ασθενειών, οι οποίες οφείλονται στην αυξημένη συγκέντρωση ουρικού οξέος (π.χ. ουρική αρθρίτιδα) (Tausche AK et al., 2006).

Η αλλοπουρινόλη είναι αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης (Εικόνα 20) (Kelley and Beardmore 1990). Χορηγείται ως φάρμακο σε ασθένειες (π.χ. ουρική αρθρίτιδα) και είναι εξειδικευμένος αναστολέας του ενζύμου γιατί είναι ένα δομικό ισομερές της υποξανθίνης (Parks and Granger, 1986).





**Εικόνα 20:** Η αλλοπουρινόλη αναστέλλει την δράση της οξειδάσης της ξανθίνης.

Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες και συγκεκριμένα τα φλαβονοειδή επηρεάζουν την δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης με αποτέλεσμα να προκαλούν αναστολή του ενζύμου. Ο τρόπος της αναστολής που προκαλούν κάποια φλαβονοειδή μπορεί να είναι ανταγωνιστικός, μη ανταγωνιστικός ή μικτός (Πίνακας 5) (Cotelle N. 2001).









**Πίνακας 5:** Ο τρόπος αναστολής κι οι ουσίες των φλαβονοειδών που προκαλούν αναστολή στην οξειδάση της ξανθίνης.

Classes of flavonoids	Compounds	Type inhibition
Flavanol	Catechin	Uncompetitive
	Epicatechin	Mixed
	Epigallocatechin	Mixed
	Epigallocatechin gallate	Competitive
	Epicatechin gallate	Mixed
Flavone	luteolin	Mixed
	5,6,7-trihydroxyflavone	Non competitive
	3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone	Competitive
	7,3',4',5'-tetrahydroxyflavone	Competitive
	3,7,3',4',5'-penta-hydroxyflavone	Competitive
Flavanone	7,4'-dihydroxyflavanone	Mixed
Chalcone	4,2',4''-trihydroxychalcone	Mixed
Dihydrochalcone	Palacetin	Mixed
Flavonol	Quercetin	Mixed [56, 64], Competitive
	Myricetin	Mixed
	Kaempferol	Mixed
	Isohammetin	Mixed

### 1.7. Σκοπός

Στα πλαίσια μιας γενικότερης μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων διάφορων εκχυλισμάτων ελληνικών ψυχανθών πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη. Τα εκχυλίσματα έχουν ήδη μελετηθεί για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Οι δράσεις τους αποδόθηκαν στις περιεχόμενες πολυφαινολικές ουσίες. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης αυτών των εκχυλισμάτων ψυχανθών καθώς κλασμάτων πολυφαινολών που απομονώθηκαν από κάποια από αυτά στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Το ένζυμο αυτό είναι ίσως η κύρια πηγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση αλλά συμβάλει επίσης και στην παραγωγή του ουρικού οξέως του σημαντικότερου αντιοξειδωτικού του πλάσματος.

1.8. Ελληνικά ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*

<p>Πόα</p> <p><i>Phaseolus vulgaris</i></p> 	<p>Το γένος <i>Phaseolus</i> έχει 50 είδη φυτών τα οποία προέρχονται από την Αμερική. Πιο χαρακτηριστικό από όλα είναι το κοινό φασόλι (<i>Phaseolus vulgaris</i>) το οποίο είναι ένα φυλλώδης ετήσιο φυτό, φτάνει τα 2m. Καλλιεργείται παγκοσμίως σε τροπικά, ημιτροπικά και ήπια κλίματα καθώς σε μεγάλες ποσότητες και στην Ελλάδα. Πολλά είδη <i>Phaseolus</i> καταναλώνονται και ως τρόφιμα (<a href="http://www.Wikipedia.com">www.Wikipedia.com</a>).</p>	<p>Σπερμάτα</p> <p><i>Phaseolus vulgaris</i></p> 
<p>Πόα</p> <p><i>Vicia faba</i></p> 	<p>Το γένος <i>Vicia</i> έχει 140 ανθοφόρα φυτά, τα οποία είναι γνωστά ως βίκoi και προέρχονται από την Ευρώπη, την Ασία και την Αφρική. Το είδος <i>Vicia faba</i> προέρχονται από την Βόρεια Αφρική και την Νοτιοδυτική Ασία το οποίο καλλιεργείται σε μεγάλο βαθμό και σε άλλες περιοχές. Είναι ετήσιο φυτό και φτάνει το 1m. Οι καρποί των <i>Vicia faba</i> είναι γνωστοί ως κουκιά, καταναλώνονται ως τρόφιμα και είναι σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής. Πολλοί άνθρωποι αποφεύγουν τα κουκιά για τις αλλεργικές αντιδράσεις που προκαλεί. Πρόκειται για ένα διπλοειδές φυτό με 12 χρωμοσώματα (6 ομόλογα ζεύγη). Τα φύλλα του φυτού είναι πτεροειδή και ο καρπός (legume) είναι ένα πλατύ σκληρό περικάρπιο οσπρίου με μια πλατιά χνουδωτή επιφάνεια που μέσα περιέχει 3-8 σπόρους (<a href="http://www.Wikipedia.com">www.Wikipedia.com</a>).</p>	
<p>Πόα</p> <p><i>Vicia tenuifolia</i></p> 	<p>Το <i>Vicia tenuifolia</i> είναι πολυετές φυτό και φτάνει το 1m. Συναντάται σε ορεινές περιοχές. Τα φύλλα που αποτελούνται από τα λεπτά γραμμικά φυλλάδια και τα άνθη του είναι ερμαφρόδιτα (<a href="http://www.Wikipedia.com">www.Wikipedia.com</a>).</p>	<p>Καρποί</p> <p><i>Vicia tenuifolia</i></p> 
<p>Πόα</p> <p><i>Lotus edulis</i></p> 	<p>Το γένος <i>Lotus</i> έχει 150 είδη φυτών τα οποία προέρχεται από την Ευρώπη και συγκεκριμένα από την περιοχή της Μεσογείου. Το φυτό <i>Lotus edulis</i> είναι ετήσιο, φτάνει τα 0,5m και καταναλώνεται και ως τρόφιμο (<a href="http://www.Wikipedia.com">www.Wikipedia.com</a>).</p>	<p>Καρποί, Περικάρπιο</p> <p><i>Lotus edulis</i></p> 
<p>Πόα</p> <p><i>Lotus longisiliquosus</i></p> 	<p>Το γένος <i>Lotus</i> έχει 150 είδη φυτών τα οποία προέρχεται από την Ευρώπη και συγκεκριμένα από την περιοχή της Μεσογείου (<a href="http://www.Wikipedia.com">www.Wikipedia.com</a>).</p>	



<p>Πόα</p> <p><i>Lupinus albus</i></p> 	<p>Το φυτό <i>Lupinus albus</i> είναι ένα παραδοσιακό όσπριο γνωστό ως λυκίσκος και καλλιεργείται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου. Είναι ετήσιο φυτό, φτάνει τα 1,2m και είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες, αμινοξέα και φλαβονοειδή. Επίσης, εμφανίζει μεγάλη αντοχή στα κρύο (www.Wikipedia.com).</p>	<p>Σπέρματα</p> <p><i>Lupinus albus</i></p> 
<p>Πόα</p> <p><i>Lens culinaris</i></p> 	<p>Το φυτό <i>Lens culinaris</i> είναι η γνωστή μας φακή και προέρχεται από την Ασία. Είναι ετήσιο φυτό, ανήκει στην κατηγορία των οσπρίων και φτάνει τα 0,5m. Καθένα από τα φύλλα της φακής αποτελείται από 6 ζεύγη μακρών φυλλαρίων που καταλήγουν σε αγκάθι. Το μήκος των φυλλαρίων αυτών ξεπερνά τα 10 εκατοστά. Σχηματίζει σπόρους οι οποίοι αναπτύσσονται στους λοβούς. Ο λοβός δεν ξεπερνά τα 3 εκατοστά και περιέχει 2-3 μικρούς σπόρους. Οι φακές έχουν διάμετρο 3-10 χιλιοστά. Οι φακές είναι άφθονες σε πρωτεΐνες και αμινοξέα (www.Wikipedia.com).</p>	<p>Σπέρματα</p> <p><i>Lens culinaris</i></p> 
<p>Πόα</p> <p><i>Tetragonolobus purpureus</i></p> 	<p>Το <i>Tetragonolobus purpureus</i> είναι μονοετές, χνουδωτό φυτό και φτάνει τα 0,3m ύψους. Τα άνθη είναι πορφυρού χρώματος, σχηματίζουν σπόρους οι οποίοι αναπτύσσονται στους λοβούς. Οι λοβοί περιέχουν τους σπόρους οι οποίοι είναι κυματοειδείς και χωρίς τριχίδια (www.Wikipedia.com).</p>	<p>Καρποί</p> <p><i>Tetragonolobus purpureus</i></p> 
<p>Πόα</p> <p><i>Lathyrus laxiflorus</i></p> 	<p>Το γένος <i>Lathyrus</i> έχει 160 είδη και αναπτύσσεται στην Ευρώπη, στην Αμερική, Ασία και στην Αφρική. Άλλα είδη είναι ετήσια και άλλα πολυετή και φτάνουν φτάνει τα 0,4m. Τα <i>Lathyrus</i> σχηματίζουν σπόρους οι οποίοι αναπτύσσονται στους λοβούς. Οι λοβοί περιέχουν συνήθως 4 έως 7 σπόρους που είναι μικροί, συνήθως στρογγυλοί και έντονα χρωματισμένοι. Το <i>Lathyrus laxiflorus</i> είναι μη εδώδιμο ενώ το <i>Lathyrus clymenum</i> (αρακάς) είναι εδώδιμο (www.Wikipedia.com).</p>	<p>Πόα</p> <p><i>Lathyrus clymenum</i></p> 
<p>Πόα</p> <p><i>Lathyrus sativus</i></p> 	<p>Το <i>Lathyrus sativus</i> (φάβα) αναπτύσσεται ιδιαίτερα στη περιοχή της Μεσογείου (www.Wikipedia.com).</p>	

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Υλικά

#### 2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (SIGMA,USA)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Panreac,Spain)

EDTA (Panreac,Spain)

Ξανθίνη (SIGMA,USA)

Οξειδάσης της ξανθίνης bovine milk (SIGMA,USA)

Αλλοπουρινόλη (SIGMA,USA)

#### 2.1.2. Εκχυλίσματα ελληνικών ψυχανθών, κλάσματα και καθαρά μόρια που απομονώθηκαν από κάποια από αυτά

Στην παρούσα εργασία, συνολικά μελετήθηκαν 17 υδατικά και 17 μεθανολικά εκχυλίσματα ψυχανθών (Πίνακας 6). Επίσης μελετήθηκαν, 10 κλάσματα μειγμάτων φλαβονοειδών που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Vicia faba* (Πίνακας 7) καθώς και 4 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis* (Πίνακας 8). Η χημική δομή και η αναλογία των μορίων παρατίθεται στο Παράρτημα.

Πίνακας 6: Υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας *Leguminosae*

Υδατικά εκχ. (κωδικός)	Μεθανολικά εκχ. (κωδικός)	Τμήματα του φυτού από το οποίο προήλθαν τα εκχυλίσματα
AAW16	AAM16	Πόα <i>Vicia faba</i>
AAW13	AAM13	Πόα <i>Phaseolus vulgaris</i>
AAW6	AAM6	Πόα <i>Lathyrus laxiflorus</i>
AAW17	AAM17	Πόα <i>Lupinus albus</i>
AAW5	AAM5	Πόα <i>Lotus longisiliquosus</i>
AAW7	AAM7	Πόα <i>Vicia tenuifolia</i>
AAW15	AAM15	Πόα <i>Lotus edulis</i>
AAW18	AAM18	Πόα <i>Lens culinaris</i>
AAW14	AAM14	Καρποί <i>Tetragonolobus purpureus</i>
AAW15K	AAM15K	Καρποί <i>Lotus edulis</i>
AAW19	AAM19	Πόα <i>Tetragonolobus purpureus</i>
AAW12	AAM12	Περικάρπιο <i>Lotus edulis</i>
AAW1	AAM1	Καρποί <i>Vicia tenuifolia</i>
AAW10	AAM10	Σπέρματα <i>Lens culinaris</i>
AAW9	AAM9	Σπέρματα <i>Phaseolus vulgaris</i>
AAW3	AAM3	Σπέρματα <i>Lupinus albus</i>
AAW8	-	Πόα <i>Lathyrus clymenum</i>
-	AAM11	Πόα <i>Lathyrus sativus</i>



Πίνακας 7: Κλάσματα-μείγματα φλαβονοειδών από τα φυτά *Vicia faba* και κλάσματα καθαρών μορίων *Lotus edulis*

Κλάσματα από το <i>Vicia faba</i> (κωδικός)	Κλάσματα από το <i>Lotus edulis</i> (κωδικός)
Vfm 6-9 (B)	Le C6
Vfm 13-15 (C)	Le D6
Vfm 25-28 (E)	Le C2
Vfm 32-34 (F)	Le D3
Vfm 76-81 (I)	
Vfm 92-97 (K)	
Vfm 115 (L)	
Vfm 135-137 (N)	
Vfm 155-160 (P)	
Vfm 171-176 (Q)	

## 2.2. Μέθοδοι

Μέτρηση της επίδρασης των βιολογικών ιδιοτήτων διάφορων εκχυλισμάτων ελληνικών ψυχανθών στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης.

### 2.2.1. Αρχή της μεθόδου

Η δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης υπολογίστηκε με βάση την παραγωγή του ουρικού οξέος μέσω της οξειδωσης της ξανθίνης. Η εκτίμηση της ανασταλτικής ή επαγωγικής δράσης ενός εκχυλίσματος βασίστηκε στην μεταβολή του ρυθμού παραγωγής του ουρικού οξέος.

#### 2.2.1.α. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης υποστρώματος στην οποία το ένζυμο βρίσκεται σε κορεσμό

Για την μελέτη της ανασταλτικής δράσης μιας εξεταζόμενης ουσίας ή εκχυλίσματος αρχικά προσδιορίζεται η συγκέντρωση του υποστρώματος στην οποία το ένζυμο βρίσκεται σε κορεσμό, δηλαδή δρα με την μέγιστη ταχύτητα ( $V_{max}$ ).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης υποστρώματος που η οξειδάση της ξανθίνης δρα με την μέγιστη ταχύτητα δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις ξανθίνης (0.64, 0.96, 1.92, 4.8, 9.6, 19.2  $\mu\text{M}$ ). Το μείγμα της αντίδρασης (500  $\mu\text{L}$ ) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 33 mM pH 7.5 με EDTA 0.1 mM, και ξανθίνη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η αντίδραση ξεκινά αμέσως μετά την προσθήκη 17  $\mu\text{L}$  (0.043 units) οξειδάσης της ξανθίνης (Πίνακας 8). Ο ρυθμός παραγωγής του ουρικού οξέος προσδιοριζόταν σε θερμοκρασία δωματίου στα 295 nm για 4 min και ακολουθούσε υπολογισμός της μεταβολής της απορρόφησης /λεπτό ( $\Delta_{\text{ABS}}/\text{min}$ ) και της ταχύτητας της

αντίδρασης (Πίνακας 9). Ο υπολογισμός της μεταβολής της απορρόφησης/λεπτό υπολογίστηκε στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης. Κάθε δείγμα δοκιμαζόταν εις τριπλούν.

Πίνακας 8: Ποσότητες που προσθέτονται στο μείγμα της αντίδρασης.

	C <sub>1</sub> (0.64 μM)	C <sub>2</sub> (0.96 μM)	C <sub>3</sub> (1.92 μM)	C <sub>4</sub> (4.8 μM)	C <sub>5</sub> (9.6 μM)	C <sub>6</sub> (19.2 μM)
Buffer	403μl	403μl	403μl	403μl	403μl	403μl
δ/μα Ξανθίνης	80μl	80μl	80μl	80μl	80μl	80μl
XO (ένζυμο)	17μl	17μl	17μl	17μl	17μl	17μl
Vτελ	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl

Ο υπολογισμός της ταχύτητας του ενζύμου γίνεται με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$V = 1 \times 1000 \times \frac{\text{Όγκος κυψελίδας (0.5ml)}}{\text{Μοριακή απορροφητικότητα προϊόντος}} \times \frac{\text{Ρυθμός αλλαγής της απορρόφησης / λεπτό}}{\text{Ποσότητα ενζύμου στην κυβέττα (mg)}}$$

Ρυθμός αλλαγής της απορρόφησης/λεπτό: Δabs/min.

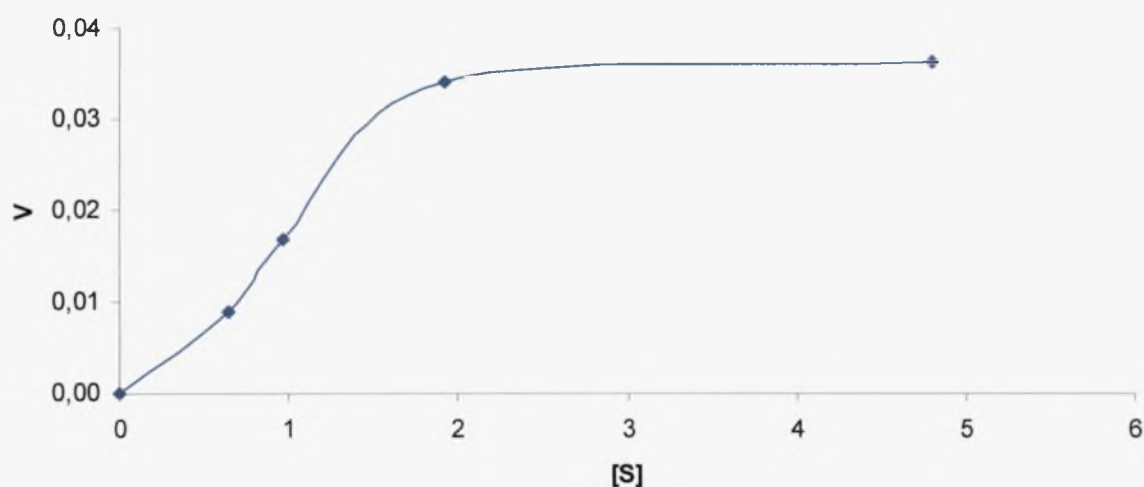
Μοριακή απορροφητικότητα του προϊόντος (ουρικού οξέος): 9600.

Η ποσότητα του ενζύμου στην κυβέττα είναι 0.054mg.

Πίνακας 9: Τιμές της ταχύτητας της αντίδρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

Συγκέντρωση ξανθίνης μM [S]	ΔABS/min	Ταχύτητα [V] μmol/min/mg ενζύμου
0,64	0,009	0,0094
0,96	0,018	0,018
1,92	0,035	0,036
<b>4,8</b>	<b>0,038</b>	<b>0,038</b>
9,6	0,038	0,038
19,2	0,038	0,038

Με τα παραπάνω στοιχεία έγινε η καμπύλη ταχύτητας συγκέντρωσης υποστρώματος V/[S]. Η συγκέντρωση του υποστρώματος **4.8 μM** είναι η συγκέντρωση στην οποία το ένζυμο είναι σε κορεσμό και άρα δρα στην μέγιστη ταχύτητα. Σε αυτή τη συγκέντρωση υποστρώματος εξετάστηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων (σε αυτή τη συγκέντρωση η δράση του ενζύμου είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος).



**Διάγραμμα 1:** Καμπύλη ταχύτητας και συγκέντρωσης υποστρώματος της οξειδάσης της ξανθίνης

### 2.2.2. Επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων και κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από τα εκχυλίσματα στην δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης.

Το μείγμα της αντίδρασης (500  $\mu\text{L}$ ) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 33 mM pH 7.5 με EDTA 0.1 mM, ξανθίνη (4.8  $\mu\text{M}$ ) και εκχύλισμα ή κλάσμα καθαρών μορίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η αντίδραση ξεκινά αμέσως μετά την προσθήκη 17  $\mu\text{L}$  οξειδάσης της ξανθίνης (2.55 u/mL αραιωμένο σε  $\text{H}_2\text{O}$ ) (Πίνακας 10). Ο ρυθμός παραγωγής του ουρικού οξέος προσδιοριζόταν σε θερμοκρασία δωματίου στα 295 nm για 4 min. Κάθε δείγμα δοκιμαζόταν εις τριπλούν.

**Πίνακας 10:** Ποσότητες που προστίθενται στο μείγμα της αντίδρασης..

	Control	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
δ/μα εκχύλ.	-	80 $\mu\text{L}$ (6)	80 $\mu\text{L}$ (5)	80 $\mu\text{L}$ (4)	80 $\mu\text{L}$ (3)	80 $\mu\text{L}$ (2)
Buffer	403 $\mu\text{L}$	323 $\mu\text{L}$	323 $\mu\text{L}$	323 $\mu\text{L}$	323 $\mu\text{L}$	323 $\mu\text{L}$
δ/μα ξανθίνης	80 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$
XO (ένζυμο)	17 $\mu\text{L}$	17 $\mu\text{L}$	17 $\mu\text{L}$	17 $\mu\text{L}$	17 $\mu\text{L}$	17 $\mu\text{L}$
Ντελ	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$

Επίσης πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του ενζύμου με την αλλοπουρινόλη ως μάρτυρα ανασταλτικής δράσης. Η αλλοπουρινόλη είναι εξειδικευμένος και ισχυρός αναστολέας του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης. Προκαλεί αναστολή IC<sub>50</sub> στην XO, σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (2.1  $\mu\text{M}$ ).

### 2.2.3. Υπολογισμός αναστολής - $IC_{50}$ .

Στο πείραμα μετρήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης του ουρικού οξέος στα 295 nm για 4 min.

#### Τύπος υπολογισμού της αναστολής

Για κάθε δείγμα υπολογιζόταν η μέση τιμή της μεταβολής της απορρόφησης στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης. Η αναστολή παραγωγής του ουρικού οξέος υπολογιζόταν με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αναστολή XO} = \frac{M.O. \Delta_{ABS} \text{ control} - M.O. \Delta_{ABS} C_x}{M.O. \Delta_{ABS} \text{ control}} \times 100$$

*M.O.  $\Delta_{ABS}$  control*: Μέσος όρος της μεταβολής της απορρόφησης του *control*.

*M.O.  $\Delta_{ABS} C_x$*  : Μέσος όρος της μεταβολής της απορρόφησης του  $C_x$  εκχυλίσματος

Το control περιέχει όλα τα συστατικά της αντίδρασης εκτός από διάλυμα εκχυλίσματος. Σε κάθε εκχύλισμα ή κλάσμα προσδιορίστηκε το  $IC_{50}$ . Ως  $IC_{50}$  ορίζεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος ή κλάσματος, η οποία προκαλεί κατά 50% ελάττωση της παραγωγής ουρικού οξέος.

### 2.2.4. Στατιστική ανάλυση

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett. Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης  $r$  κατά Spearman. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για  $p < 0,05$ .

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης.

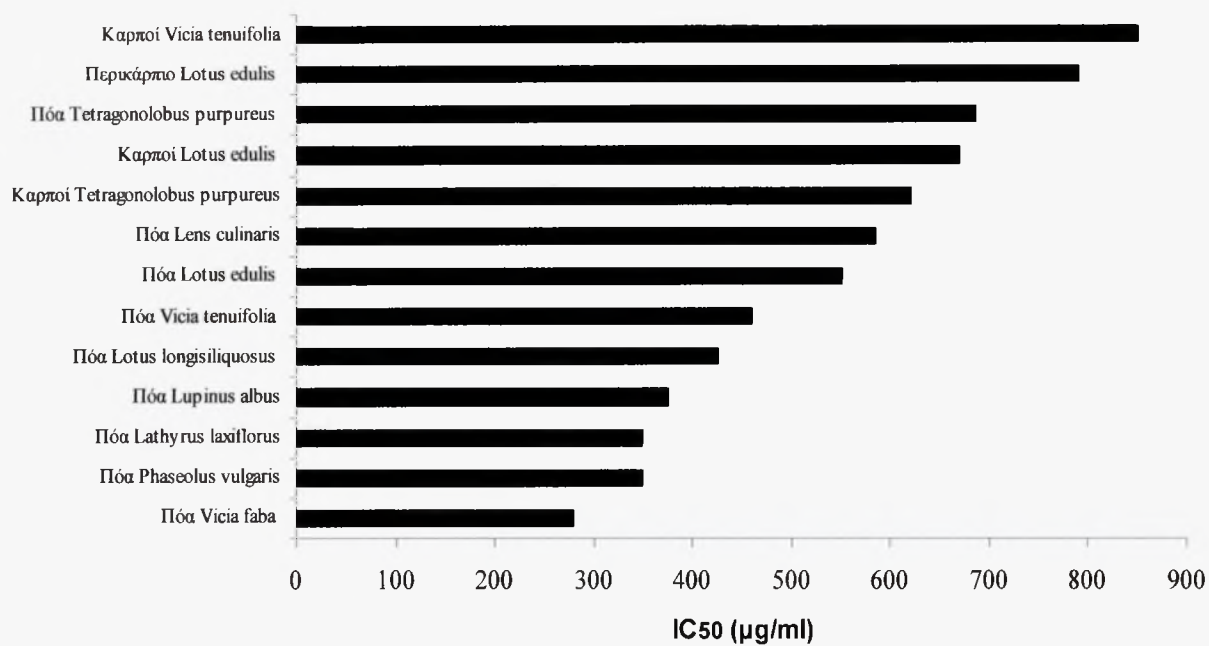
Από τα 17 υδατικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, αναστολή στην δράση της οξειδάσης της ξανθίνης εμφάνισαν τα 13, ενώ 4 εκχυλίσματα δεν εμφάνισαν καμία δράση. (Πίνακας 11). Το εύρος των τιμών του IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 280μg/ml έως 850μg/ml (Διάγραμμα 2). Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από την πόα του φυτού *Vicia faba*, ενώ το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από τους καρπούς του φυτού *Vicia tenuifolia* με τιμές IC<sub>50</sub> 280μg/ml και 850μg/ml, αντίστοιχα. Τα εκχυλίσματα που δεν προκάλεσαν αναστολή στη δράση του ενζύμου ήταν αυτά που προέκυψαν από τα σπέρματα των φυτών *Lens culinaris*, *Phaseolus vulgaris*, *Lupinus albus* και *Lathyrus clymenum*. Με βάση τις τιμές του παράγοντα γραμμικής συσχέτισης (r) της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και του ποσοστού αναστολής της δραστικότητας του ενζύμου η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων παρουσίασε υψηλή γραμμική συσχέτιση (r = 0.949-0.988) (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στην δραστικότητα της XO.

Υδατικά Εκχυλίσματα (μg/ml)	% Αναστολή XO							IC <sub>50</sub> (μg/ml)	r
	100	200	300	400	600	800	1000		
Πόας <i>Phaseolus vulgaris</i>	NI	27*	36*	57*	70*	-	-	350	0.972
Σπερμάτων <i>Phaseolus vulgaris</i>	No activity							-	-
Πόας <i>Vicia faba</i>	12	16	54*	64*	65*	-	-	280	0.949
Πόας <i>Les culinaris</i>	NI	NI	NI	21	52	-	-	585	0.641
Πόας <i>Lathyrus laxiflorus</i>	NI	25*	-	57*	82*	-	-	350	0.973
Σπερμάτων <i>Lens culinaris</i>	No activity							-	-
Περικαρπίου <i>Lotus edulis</i>	NI	NI	NI	18*	31*	51*	-	790	0.949
Πόας <i>Lotus edulis</i>	NI	16	31*	40*	54*	75*	-	550	0.988
Καρπών <i>Lotus edulis</i>	NI	21*	36*	40*	43*	64*	-	670	0.927
Σπερμάτων <i>Lupinus albus</i>	No activity							-	-
Πόας <i>Lupinus albus</i>	14	27*	37*	54*	69*	-	-	375	0.983
Πόας <i>Lotus longisiliquosus</i>	17	29*	36*	48*	65*	-	-	425	0.982
Καρπών <i>Tetragonolobus purpureus</i>	NI	NI	22	35*	47*	67*	-	620	0.980
Πόας <i>Tetragonolobus purpureus</i>	NI	NI	17*	22*	31*	78*	-	685	0.978
Σπερμάτων <i>Lathyrus clymenum</i>	No activity							-	-
Καρπών <i>Vicia tenuifolia</i>	NI	19	25	28*	34*	46*	67*	850	0.907
Πόας <i>Vicia tenuifolia</i>	NI	27	34*	44*	62*	-	-	460	0.982

r: παράγοντας γραμμικής συσχέτισης, \*: στατιστικά σημαντική αναστολή, NI: no inhibition(χωρίς δράση)< 10%





**Διάγραμμα 2:** Συγκεντρώσεις IC<sub>50</sub> υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών.

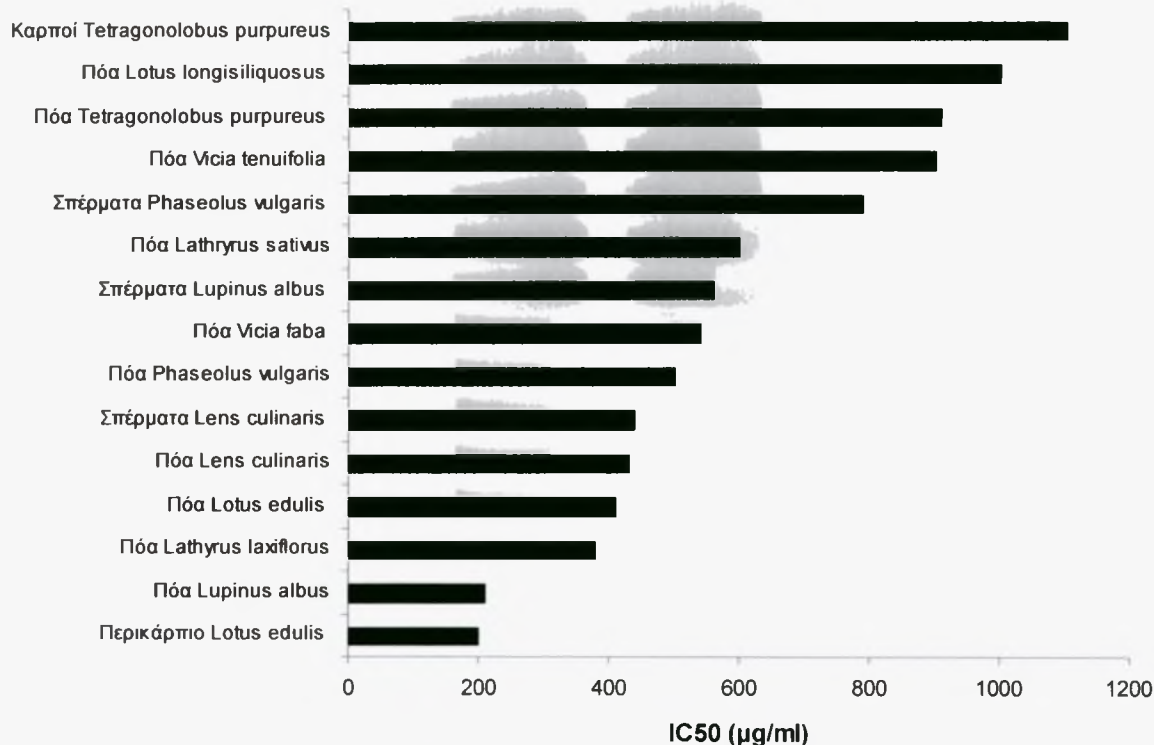
### 3.2. Επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης.

Από τα 17 μεθανολικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, αναστολή στην δράση της οξειδάσης της ξανθίνης εμφάνισαν τα 15, ενώ 2 εκχυλίσματα δεν εμφάνισαν καμία δράση (Πίνακας 12). Το εύρος των τιμών του  $IC_{50}$  κυμαινόταν από 200μg/ml έως 1100μg/ml (Διάγραμμα 3). Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από τα περικάρπια του φυτού *Lotus edulis*, ενώ το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν εκείνο των καρπών του φυτού *Tetragonolobus purpureus* με τιμές  $IC_{50}$  200μg/ml και 1100μg/ml, αντίστοιχα. Τα εκχυλίσματα που δεν προκάλεσαν αναστολή στη δράση του ενζύμου ήταν αυτά που προέκυψαν από τους καρπούς των φυτών *Vicia tenuifolia* και *Lotus edulis*. Με βάση τις τιμές του παράγοντα γραμμικής συσχέτισης ( $r$ ) της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και του ποσοστού αναστολής της δραστικότητας του ενζύμου η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων παρουσίασε υψηλή γραμμική συσχέτιση ( $r=0.946-0.986$ ) (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στην δραστικότητα της XO.

Μεθανολικά Εκχυλίσματα (μg/ml)	% Αναστολή XO							$IC_{50}$ (μg/ml)	$r$
	100	200	300	400	600	800	1000		
Πόας <i>Phaseolus vulgaris</i>	NI	12	37*	42*	59*	-	-	500	0.983
Σπερμάτων <i>Phaseolus vulgaris</i>	NI	NI	NI	20	20	51*	-	790	0.790
Πόας <i>Vicia faba</i>	NI	NI	16*	38*	55*	-	-	540	0.983
Πόας <i>Lathyrus laxiflorus</i>	NI	NI	24*	53*	58*	-	-	380	0.907
Καρπών <i>Vicia tenuifolia</i>	No activity							-	-
Πόας <i>Vicia tenuifolia</i>	NI	NI	NI	16	34*	44*	54*	900	0.866
Πόας <i>Les culinaris</i>	NI	17	38*	48*	62*	-	-	430	0.967
Σπερμάτων <i>Lens culinaris</i>	NI	11	24	44*	69*	-	-	440	0.986
Σπερμάτων <i>Lupinus albus</i>	NI	21	14	33*	53*	-	-	560	0.984
Πόας <i>Lupinus albus</i>	21	48*	55*	65*	77*	-	-	210	0.937
Περικαρπίου <i>Lotus edulis</i>	NI	50*	56*	61*	87*	-	-	200	0.948
Πόας <i>Lotus edulis</i>	NI	24*	34*	49*	68*	-	-	410	0.982
Καρπών <i>Lotus edulis</i>	No activity							-	-
Πόας <i>Lotus longisiliquosus</i>	NI	NI	NI	18	31*	36*	50*	1000	0.966
Καρπών <i>Tetragonolobus purpureus</i>	NI	17*	30*	30*	38*	39*	46*	1100	0.946
Πόας <i>Tetragonolobus purpureus</i>	NI	24*	24*	30*	39*	45*	54*	910	0.965
Πόα <i>Lathyrus sativus</i>	NI	13	33*	36*	51*	-	-	550	0.969

$r$ : παράγοντας γραμμικής συσχέτισης, \*: στατιστικά σημαντική αναστολή, NI: no inhibition(χωρίς δράση)< 10%



**Διάγραμμα 3:** Συγκεντρώσεις IC<sub>50</sub> μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών.

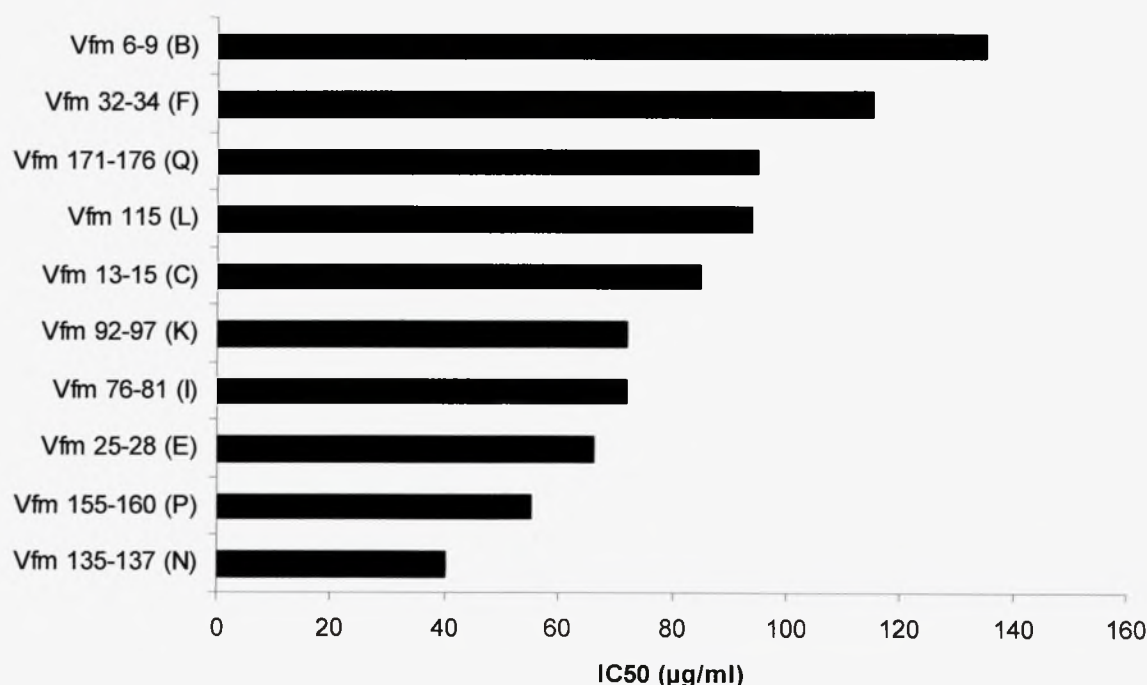
### 3.3. Επίδραση των κλασμάτων μειγμάτων φλαβονοειδών στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης.

Από τα 10 κλασμάτα μειγμάτων φλαβονοειδών που μελετήθηκαν, όλα προκαλούσαν αναστολή στην δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (Πίνακας 13). Το εύρος των τιμών του IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 40μg/ml έως 135μg/ml (Διάγραμμα 4). Το πιο δραστικό κλάσμα ήταν αυτό που προέκυψε από το Vfm 135-137, ενώ το λιγότερο δραστικό κλάσμα ήταν αυτό που προέκυψε από το Vfm 6-9, με τιμές IC<sub>50</sub> 40μg/ml και 135μg/ml, αντίστοιχα. Με βάση τις τιμές του παράγοντα γραμμικής συσχέτισης ( $r$ ) της συγκέντρωσης του κλάσματος και του ποσοστού αναστολής της δραστικότητας του ενζύμου η πλειοψηφία των κλασμάτων παρουσίασε υψηλή γραμμική συσχέτιση ( $r = 0.900-0.983$ ) (Πίνακας 13).

**Πίνακας 13:** Επίδραση των κλασμάτων-μειγμάτων στην δραστικότητα της ΧΟ.

Κλάσματα (μg/ml)	% Αναστολή ΧΟ						IC <sub>50</sub> (μg/ml)	r
	20	30	50	80	100	200		
Vfm 25-28 (E)	NI	13	34*	63*	85*	-	66	0.972
Vfm 13-15 (C)	NI	17	23	48*	52*	-	85	0.767
Vfm 6-9 (B)	11	12	19	38*	42*	66*	135	0.900
Vfm 32-34 (F)	NI	NI	39*	39*	45*	84*	115	0.950
Vfm 76-81 (I)	NI	16	30*	56*	67*	-	72	0.981
Vfm 92-97 (K)	NI	27*	28*	58*	72*	-	72	0.926
Vfm 135-137 (N)	15	40*	58*	73*	85*	-	40	0.981
Vfm 155-160 (P)	26	31*	47*	67*	74*	-	55	0.966
Vfm 171-176 (Q)	NI	NI	17	39*	55*	-	95	0.960
Vfm 115 (L)	NI	11	21	42*	53*	-	94	0.983

r: παράγοντας γραμμικής συσχέτισης, \*: στατιστικά σημαντική αναστολή, NI: no inhibition(χωρίς δράση)< 10%



**Διάγραμμα 4:** Συγκεντρώσεις IC<sub>50</sub> κλασμάτων-μειγμάτων από το φυτό *Vicia faba*.

### 3.4. Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης.

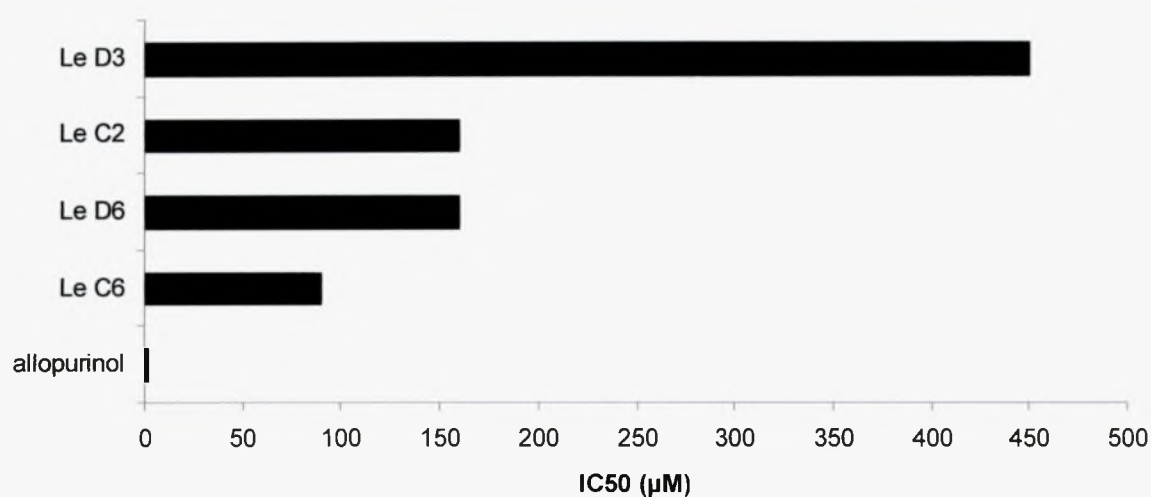
Από τα 4 κλάσματα καθαρών μορίων που μελετήθηκαν, όλα προκαλούσαν αναστολή στην δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (Πίνακας 14). Το εύρος των τιμών του IC<sub>50</sub> κυμαινόταν από 90μM έως 450μM (Διάγραμμα 5). Το πιο δραστικό κλάσμα ήταν αυτό που προέκυψε από το Le C6, ενώ το λιγότερο δραστικό κλάσμα ήταν αυτό που προέκυψε από το Le D3 με τιμές IC<sub>50</sub> 90μM και 450μM, αντίστοιχα. Με βάση τις τιμές του παράγοντα γραμμικής συσχέτισης (r) της συγκέντρωσης του κλάσματος και του ποσοστού αναστολής

της δραστηριότητας του ενζύμου η πλειοψηφία των κλασμάτων παρουσίασε υψηλή γραμμική συσχέτιση ( $r = 0.963-0.982$ ) (Πίνακας 13).

**Πίνακας 14:** Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων στην δραστηριότητα της XO.

Κλάσματα καθαρών μορίων ( $\mu\text{M}$ )	% Αναστολή XO								IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	r
	30	50	80	100	200	400	600	800		
Le D3	NI	NI	NI	NI	NI	44*	69*	83*	450	0.981
Le D6	NI	NI	11	25*	65*	93*	-	-	160	0.963
Le C2	NI	NI	28*	40*	58*	91*	-	-	160	0.933
Le C6	20	31*	40*	58*	87*	-	-	-	90	0.982

r: παράγοντας γραμμικής συσχέτισης, \*: στατιστικά σημαντική αναστολή, NI: no inhibition(χωρίς δράση)<10%



**Διάγραμμα 5:** Συγκεντρώσεις IC<sub>50</sub> κλασμάτων από το φυτό *Lotus edulis*.



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ψυχανθή είναι δικοτυλήδονα φυτά και εντάσσονται στην οικογένεια φυτών *Leguminosae*. Οι καρποί τους, τα όσπρια, καταναλώνονται ως τρόφιμα και αποτελούν σημαντικό τμήμα της ελληνικής και Μεσογειακής διατροφής (Vasilopoulou E. et al., 2005). Τα όσπρια εκτός του ότι έχουν υψηλή διατροφική αξία ως πηγή πρωτεϊνών, περιέχουν και αρκετές φυτοχημικές ουσίες. Σημαντική κατηγορία των φυτοχημικών ενώσεων που έχουν βρεθεί στα όσπρια αποτελούν οι πολυφαινόλες, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα λιγνάνια, τα στιλβένια κ.α. (A. Scalbert, 2005). Οι πολυφαινόλες, έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν σημαντικές αντιϊκές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες ενώ παράλληλα δρουν αντιοξειδωτικά συμβάλλοντας στην πρόληψη διάφορων ασθενειών που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες (Manach C. et al., 2004).

Στα πλαίσια της μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων ελληνικών ψυχανθών της οικογένειας *Leguminosae* πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν διάφορα φυτικά εκχυλίσματα (υδατικά και μεθανολικά) και κλάσματα πολυφαινόλων, που προέρχονται από διάφορα ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae* που καλλιεργούνται σε όλη την Ελλάδα. Σε προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα αυτά και κλάσματα που απομονώθηκαν από αυτά παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες (Spanou C. et al. 2008). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παρατήρηση της επίδρασης αυτών των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων, πλούσιων σε πολυφαινολικές ενώσεις, στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Έχει βρεθεί ότι πολυφαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν αναστολή στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (Cotelle N. 2001, Lin JK et al., 2000, Nagao A. et al., 1999). Το ένζυμο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό των πουρινών (Harrison R., 2002, Hille R., 2006) και κατά την διάρκεια της άσκησης καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη καθώς και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, με παράλληλη παραγωγή ελευθέρων ριζών ( $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot -}$ ) (McCord and Fridovich, 1968).

Συνολικά μελετήθηκαν 17 υδατικά και 17 μεθανολικά εκχυλίσματα ψυχανθών (Πίνακας 6) καθώς και 10 κλάσματα μειγμάτων φλαβονοειδών που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Vicia faba* και 4 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis* (Πίνακας 7).

Από τα 17 υδατικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, αναστολή στην δράση της οξειδάσης της ξανθίνης εμφάνισαν τα 13, ενώ 4 εκχυλίσματα δεν εμφάνισαν καμία δράση. (Πίνακας 11). Το εύρος των τιμών του  $IC_{50}$  κυμαινόταν από 280μg/ml έως 850μg/ml (Διάγραμμα 2). Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από την πόα του φυτού

*Vicia faba*, ενώ το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από τους καρπούς του φυτού *Vicia tenuifolia*, με τιμές  $IC_{50}$  280μg/ml και 850μg/ml, αντίστοιχα. Η παρατηρούμενη αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης αποδίδεται στις περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις. Η διαφορετική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων οφείλεται στην διαφορετική σύστασή τους, αφού προέρχονται από διαφορετικά φυτά και τμήματα φυτών έχοντας διαφορετική σύσταση σε δραστικές ουσίες.

Από τα 17 μεθανολικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, αναστολή στην δράση της οξειδάσης της ξανθίνης εμφάνισαν τα 15, ενώ 2 εκχυλίσματα δεν εμφάνισαν καμία δράση (Πίνακας 12). Το εύρος των τιμών του  $IC_{50}$  κυμαινόταν από 200μg/ml έως 1100μg/ml (Διάγραμμα 3). Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από τα περικάρπια του φυτού *Lotus edulis*, ενώ το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν εκείνο των καρπών του φυτού *Tetragonolobus purpureus*, με τιμές  $IC_{50}$  200μg/ml και 1100μg/ml, αντίστοιχα. Η αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης που παρατηρήθηκε στα μεθανολικά εκχυλίσματα, όπως και στα υδατικά εκχυλίσματα, αποδίδεται περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις. Πολυφαινολικές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από διάφορα ψυχανθή όπως η κατεχίνη, η γενιστεΐνη, η κερκετίνη, η καιμπφερόλη κ.α έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (Cotelle N. 2001, Lin JK et al., 2000, Nagao A. et al., 1999, Cos P. et al., 1998).

Ανάμεσα στα υδατικά και στα μεθανολικά εκχυλίσματα παρατηρείται ότι περισσότερα ήταν τα μεθανολικά εκχυλίσματα τα οποία ανέστειλαν την οξειδάση της ξανθίνης. Υπήρχαν υδατικά εκχυλίσματα φυτών που δεν παρουσίασαν καμία δράση (Πίνακας 11) ενώ τα αντίστοιχα μεθανολικά παρουσίασαν ανασταλτική δράση (Πίνακας 12). Επίσης, το πιο δραστικό από τα μεθανολικά εκχυλίσματα με τιμή  $IC_{50}$  200μg/ml έχει μεγαλύτερη δραστικότητα από το αντίστοιχο υδατικό εκχύλισμα με τιμή  $IC_{50}$  280μg/ml. Οι διαφορές ανάμεσα στη δράση των υδατικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων οφείλονται στη διαφορετική σύσταση των εκχυλισμάτων σε δραστικές ουσίες, καθώς υπάρχει διαφορετική διαλυτότητα των βιοδραστικών ενώσεων στο νερό και στη μεθανόλη.

Με σκοπό την εξακρίβωσή των βιοδραστικών ενώσεων στις οποίες οφείλεται η δράση των εκχυλισμάτων απομονώθηκαν 10 κλάσματα από το μεθανολικό εκχύλισμα πώας του φυτού *Vicia faba* τα οποία αποτελούσαν μείγματα φλαβονοειδών (Παράρτημα) και 4 κλάσματα καθαρών φλαβονοειδών από το μεθανολικό εκχύλισμα πώας του φυτού *Lotus edulis* (Παράρτημα).

Από τα 10 κλάσματα φλαβονοειδών που απομονώθηκαν από το φυτό *Vicia faba*, όλα προκάλεσαν αναστολή στην δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (Πίνακας 13). Το εύρος των τιμών του  $IC_{50}$  κυμαινόταν από 40μg/ml έως 135μg/ml (Διάγραμμα 4). Το πιο δραστικό

κλάσμα ήταν το Vfm 135-137, ενώ το λιγότερο δραστικό κλάσμα ήταν το Vfm 6-9, με τιμές  $IC_{50}$  40 $\mu$ g/ml και 135 $\mu$ g/ml, αντίστοιχα. Τα κλάσματα-μείγματα φλαβονοειδών, όπως φαίνεται και στο παράρτημα, αποτελούν μείγματα από γλυκοσυλιωμένες μορφές της καιμπφερόλης και της κερκετίνης. Η καιμπφερόλη, η κερκετίνη καθώς και οι γλυκοσυλιωμένες τους μορφές, έχει παρατηρηθεί ότι αναστέλλουν την δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (Cos P. et al., 1998). Έτσι, η παρατηρούμενη διαφορά στην δράση των κλασμάτων στην οξειδάση της ξανθίνης πιθανόν να οφείλεται στην διαφορετική αναλογία των γλυκοσυλιωμένων μορφών καιμπφερόλης και κερκετίνης που περιέχουν. Ακόμη αλληλεπιδράσεις που μπορεί να συμβαίνουν ανάμεσα στα φλαβονοειδή μπορεί να επηρεάζουν την δράση τους μέσα στα κλάσματα.

Αξίζει να αναφερθεί ότι τα κλάσματα σε σύγκριση με το μεθανολικό εκχύλισμα από το οποίο προέκυψαν, είναι πιο δραστικά από το αρχικό εκχύλισμα. Ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* παρουσίασε τιμή  $IC_{50}$  540 $\mu$ g/ml τα κλάσματα παρουσίασαν τιμές  $IC_{50}$  από 40 με 135 $\mu$ g/ml. Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι μέσα στο μεθανολικό εκχύλισμα υπάρχει μια ποικιλομορφία πολυφαινολικών ενώσεων, οι οποίες μπορεί να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθώς και άγνωστα συστατικά που μπορεί να αναστέλλουν την δράση των δραστικών τους μορίων. Καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα σταφυλιών έχει παρατηρηθεί, ότι παρουσιάζουν διαφορετικές δράσεις σε σχέση με τα αρχικά εκχυλίσματα (D. Stagos et al., 2005). Έτσι οι πολυφαινόλες που βρίσκονται μόνες τους στα κλάσματα δρουν με μεγαλύτερη δραστικότητα απ' ό,τι όταν αυτές βρίσκονται μέσα στο εκχύλισμα.

Και τα 4 κλασμάτα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Lotus edulis*, παρουσίασαν αναστολή στην δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (Πίνακας 14). Το εύρος των τιμών του  $IC_{50}$  κυμαινόταν από 90 $\mu$ M έως 450 $\mu$ M (Διάγραμμα 5). Το πιο δραστικό κλάσμα ήταν το Le C6, ενώ το λιγότερο δραστικό κλάσμα ήταν το Le D3 με τιμές  $IC_{50}$  90 $\mu$ M και 450 $\mu$ M, αντίστοιχα. Οι παρατηρούμενες διαφορές στην δράση των κλασμάτων καθαρών μορίων οφείλονται στην διαφορετική τους δομή. Τα καθαρά μόρια των κλασμάτων, όπως φαίνεται και στο παράρτημα, αποτελούν γλυκοσυλιωμένες μορφές της καιμπφερόλης.

Η καιμπφερόλη και κάποιες γλυκοσυλιωμένες μορφές της έχει παρατηρηθεί ότι αναστέλλουν την δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (Cos P. et al., 1998). Η καιμπφερόλη ανήκει στη κατηγορία των φλαβονοειδών οι οποίες μαζί με τις φλαβόνες από προηγούμενες μελέτες έδειξαν σημαντική ανασταλτική δράση απέναντι στην XO. Οι υδροξυλικές ομάδες στις θέσεις C5 και C7 και ο διπλός δεσμός ανάμεσα στις θέσεις C2 και C3 ήταν σημαντικές



για την δράση της οξειδάσης της ξανθίνης ( $IC_{50}$  1,06 $\mu$ M). Τα μόρια της καιμπερόλης που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία έχουν τον διπλό δεσμό στις θέσεις C2 και C3. Ωστόσο η θέση C7 είναι γλυκοσυλιωμένη. Η παρουσία του σακχάρου ίσως είναι υπεύθυνη για την μικρότερη δράση των μορίων στην οξειδάση της ξανθίνης ( $IC_{50}$  90 $\mu$ M έως 450 $\mu$ M).

Πιο συγκεκριμένα ανάμεσα στα καθαρά μόρια παρατηρείται ότι τα Le C2 και Le C6 αποτελούν ακετυλιωμένες μορφές των μορίων Le D6 και Le D3, αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στα αποτελέσματα το Le C6 έχει μεγαλύτερη δραστηριότητα από το Le D3. Η παρατηρούμενη διαφορά στη δράση των καθαρών αυτών μορίων πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία της ακετυλομάδας στο Le D3. Τα μόρια Le C2 και Le D6 δεν παρουσίασαν διαφορά στην δράση τους επομένως η ακετυλομάδα δεν προσφέρει κάποια ουσιαστική διαφορά στην δράση τους. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην διαφορετική ομάδα που είναι συνδεδεμένη με το C3 σε σχέση με τα Le C6 και Le D3 (Παράρτημα).

Αν συγκρίνουμε τα καθαρά μόρια με την αλλοπουρινόλη, παρατηρούμε ότι η τιμή  $IC_{50}$  της αλλοπουρινόλης είναι 2,1 $\mu$ M ενώ η τιμή  $IC_{50}$  του πιο δραστικού μορίου ήταν 90 $\mu$ M. Αυτό οφείλεται στο ότι η αλλοπουρινόλη είναι δομικό ισομερές με την υποξανθίνη και έτσι παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη συγγένεια με την οξειδάση της ξανθίνης, ενώ τα κλάσματα καθαρών μορίων είναι γλυκοσυλιωμένες μορφές καιμπερόλης και παρουσιάζουν μικρότερη αλλά στατιστικά σημαντική αναστολή. Ο προσδιορισμός του τύπου αναστολής που προκαλούν τα καθαρά μόρια στην δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης αποτελεί πολύ σημαντικό αντικείμενο περαιτέρω μελέτης. Τα καθαρά μόρια που μελετήθηκαν, δεν εμφανίζουν εξειδικευμένη δράση απέναντι στην οξειδάση της ξανθίνης αλλά έχουν πλειοτροπική δράση (Spanou C. et al. 2008). Επίσης, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως σημαντικά στοιχεία διατροφής προσφέροντας στον οργανισμό τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες.

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα παρουσίασαν ανασταλτική δράση στην οξειδάση της ξανθίνης. Η δράση των εκχυλισμάτων οφείλεται στις περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις, καθώς κλάσματα καθαρών μορίων και καθαρά μόρια που απομονώθηκαν από αυτά παρουσίασαν σημαντική ανασταλτική δράση, η οποία ήταν και πιο ισχυρή. Η δράση των παραπάνω ουσιών στη οξειδάση της ξανθίνης πέραν του ότι μειώνουν την παραγωγή των ελευθέρων ριζών έχει ως αποτέλεσμα και την μείωση του παραγόμενου ουρικού οξέος που είναι ένα απ' τα σημαντικά αντιοξειδωτικά του οργανισμού. Η δράση της οξειδάσης της ξανθίνης είναι πιο έντονη κατά τη διάρκεια της άσκησης. Λαμβάνοντας υπόψη το διπλό ρόλο του ενζύμου

(αναστολή της παραγωγής ελευθέρων ριζών και ουρικού οξέος), η χορήγηση των μορίων που μελετήθηκαν πριν την άσκηση χρήζει περαιτέρω μελέτης.

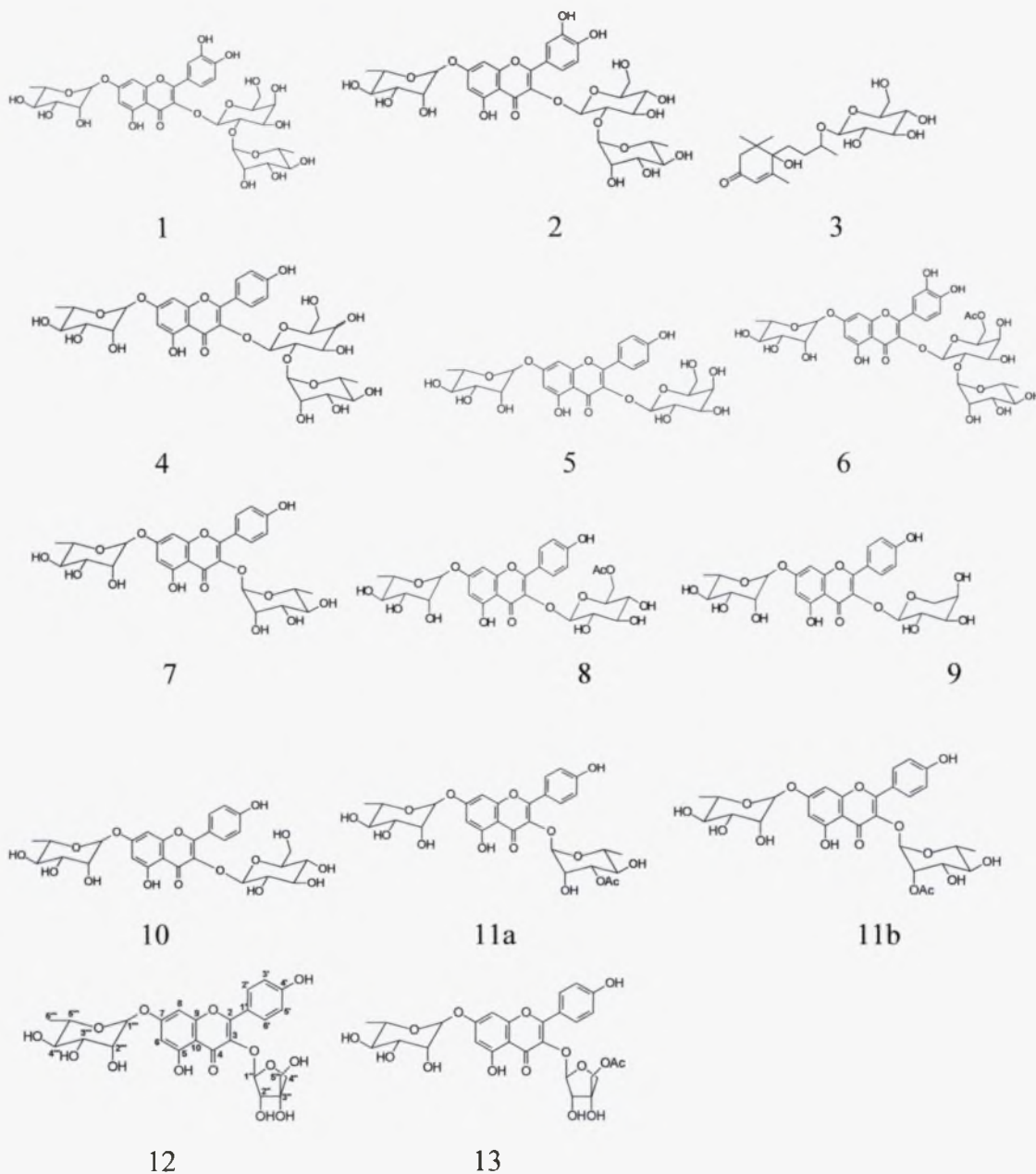


## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Κλάσματα μειγμάτων και καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις που εξετάστηκαν

Μεθανολικού εκχ. πόας <i>Vicia faba</i> *	Μεθανολικού εκχ. πόας <i>Lotus edulis</i> **
Vfm 92-97 (K) 5:10:6 (4:1:2)	Le B (C2)13
Vfm 115 (L) Mixture of none polar compounds	Le E (C6)11 isomers (11a, 11b)
Vfm 135-137 (N) 7:8 (2:1)	Le N (D3)7
Vfm 32-34 (F) 3:4 (2:1)	Le O (D6)12
Vfm 76-81 (I) 5:6 (1:4)	
Vfm 155-160 (P) 9:10 (1:1)	
Vfm 6-9 (B) 1:2:3 (3:1:3)	
Vfm 13-15 (C) 1:2 (2:1)	
Vfm 25-28 (E) 3:4 (3:1)	
Vf171-176 (Q) 5:10 (2:3)	

\*Μείγματα πολυφαινολικών ενώσεων; \*\*Καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις



**Ονομασίες των ενώσεων:**

- 1) quercetin 3-Orhamnopyranosyl(1→2)-galactopyranoside-7-O-rhamnopyranoside,
- 2) quercetin 3-O-rhamnopyranosyl(1→2)-glucopyranoside-7-O-rhamno-pyranoside,
- 3) 9-O-D-glycopyranosyloxy-6-hydroxy-3-oxo-R-ionol,
- 4) kaempferol 3-O-rhamnopyranosyl(1→2)-galactopyranoside-7-O-rhamnopyranoside and kaempferol 3-O-rha-mnopyranosyl(1→2)-glucoopyranoside-7-O-rhamnopyranoside,
- 5) kaempferol 3-O-galacto-pyranoside-7-O-rhamnopyranoside,
- 6) quercetin 3-Orhamnopyranosyl(1→2)-6-O-acetylga-lactopyranoside-7-O-rhamnopyranoside,
- 7) kaempferol 3,7-di-O-rhamnopyranoside,
- 8) kaempferol 3-O-(6-O-acetylglucopyranoside)-7-O-rhamnopyranoside,
- 9) kaempferol 3-O-ara-binoside-7-O-rhamnopyranoside,
- 10) kaempferol 3-O-glycopyranoside-7-O-rhamnopyra-noside
- 11) (a) kaempferol 3-O-(3-O-acetylramnopyranosyl)-7-O-rhamnopyranosyl ή (b) ka-empferol 3-O-(2-O-acetylramnopyranosyl)-7-O-rhamnopyranosyl,
- 12) kaempferol 3-O-apiofuranosyl-7-O-rhamnopyranosyl,
- 13) kaempferol 3-O-(5-O-acetylapiosyl)-7-O-rhamno-pyranosyl.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας- Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του κυττάρου. (2000). Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
2. Asami, S., Hirano, T., Yamaguchi, R., Tomioka, Y., Itoh, H., Kasai, H., Increase of a type of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine and its repair activity in human leukocytes by cigarette smoking. *Cancer Res.* 56:2546 –2549; 1996.
3. Bahorun T., Soobrattee MA, Luximon-Ramma V, Aruoma OI, Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease., *IJMU*, Vol1, No2, Jul-Dec 2006.
4. Boveris A, Cadenas E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. *Inc* 1997; 1-25.
5. Bulkley G. Free radicals and reactive oxygen species. (2002). The evolution of a scientific concept. *Cosmos Journals*.
6. Carlo G.D., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F.(1999), Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, **65**(4):337-353
7. Cooper D.A., Eldridge A.L. Peter J.C.. Dietary carotenoids and certain cancer, heart disease and age-related macular degeneration: a review of recent research. *Nutr Rev* 1999;57:201-14.
8. Cos P., Ying L., Calomme M, Hu J.P., Cimanga K., Poel B.V., Pieters L., Vlietinck A.J., Berghe D.V..(1998) Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *J. Nat. Prod.*, 61 (1), 71-76
9. Cotellet N., Role of Flavonoids in Oxidative Stress, *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2001, 1, 569-590.
10. Cutler R. (1994) Antioxidants, aging and longevity. In: Pryor W A (ed) *Free Radicals in Biology*, vol 6. Orlando, FL: Academic Press, Inc. pp 381-395
11. Dehghan A. et al. (2007). High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Care* 31: 361.
12. Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 2001; 10: 125-40.
13. Duranti M., (2006), Grain legume proteins and nutraceutical properties, *Filoterapia*, **77**:67-82
14. Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Nishino T, Pai EF (September 2000). Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase:

- structure-based mechanism of conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (20): 10723–8.
15. Fang Y.Z., Yang S., Wu G.Y.. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002, 18:872–879
  16. Ferguson P.L., Kurowska E., Freeman D.J., Chambers A.F. and Koropatnick D.J.. A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines. World Cancer Research Fund International/American Institute for Cancer Research International Research Conference on Food, Nutrition & Cancer. 2002.
  17. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 2006; 36(4):327-58.
  18. Gabi, *Cellscience Reviews*, Vol.1, No.2, 2004.
  19. Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003;89(1):14-20.
  20. Gutteridge J.. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. (1995). *Clinical Chemistry* 41/12,1819-1828.
  21. Halliwell B, Free radicals and other reactive species in disease, *Encyclopedia of life sciences.* (2001)
  22. Halliwell B. and Gutteridge JMC. (1998). *Free radicals in biology and chemistry.* New York: Oxford Science Publications.
  23. Harborne, J. B. and Simmonds, N. W., 1964, *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London, pp. 101.
  24. Harrison R (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radic. Biol. Med.* 33 (6): 774–97.
  25. Heinig M, Johnson RJ. (2006). Role of uric acid in hypertension, renal disease, and metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med.* 73(12): 1059–64.
  26. Hellsten Y, Frandsen U, Orthenblad N, Sjodin B, Richter EA. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: A role of inflammation. *J. Physiol.* 1997; 498:239-248.
  27. Hellsten Y, Sjodin B, Richter EA, et al. Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *Am J Physiol* 1998; 274: E600-6.
  28. Hensley, K., and Floyd, R.A. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: A look back, a look ahead. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002; 397:377-383.

29. Hille R. (2006). Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase. *European Journal of Inorganic Chemistry* 2006 (10): 1905–2095.
30. Inoue T, Mu Z, Sumikawa K, Adachi Z, Okochi T. Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84:720–725.
31. Ilja CW Arts and Peter CH Hollman (2005), Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies, *Am J Clin Nutr.*, 81:317S–25S.
32. Iwanaga T, Kobayashi D, Hirayama M, Maeda T, Tamai I (December 2005). Involvement of uric acid transporter in increased renal clearance of the xanthine oxidase inhibitor oxypurinol induced by a uricosuric agent, benzbromarone. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 33 (12): 1791–5.
33. Kelley W.N. and Beardmore T.D., Allopurinol: Alteration in Pyrimidine Metabolism in Man. (1970) Vol. 169. no. 3943, pp. 388 - 390
34. Keys S.A., Zimmerman W.F., Antioxidant activity of retinol, glutathione and taurine in bovine photoreceptor cell membranes. *Exp. Eye Res* 1999;68:693-702.
35. Klebanoff SJ. Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. In: Gallin, J. I.; Goldstein, I. M.; Synderman, R., eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven; 1988:391– 444.
36. Κουρέτας Δημήτριος *Βιοχημική Τοξικολογία* (2003).
37. Kurlovich B.S., Repyev S.I., (1995), The gene bank and breeding of grain legumes, *The N.I Vavilov Institute of Plant Industry*, 111:438
38. Jen-Kun Lin, Ping-Chung Chen, Chi-Tang Ho and Shoei-Yn Lin-Shiau(2000). Inhibition of Xanthine Oxidase and Suppression of Intracellular Reactive Oxygen Species in HL-60 Cells by Theaflavin-3,3-digallate (-)-Epigallocatechin-3-gallate and Propyl Gallate. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 2736-2743
39. Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N, et al. Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 396-411.
40. Luo YC et al. (2006). An amperometric uric acid biosensor based on modified Ir-C electrode. *Biosens Bioelectron* 22(4): 482–8.
41. Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L.(2004), Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, 79:727-47
42. May J.M., Mendiratta S., Hill K.E. and Burk R.F. (1997) Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *Journal of Biological Chemistry* 272,22607±22610.



43. McCord, JM, and Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1968. 243: 5753-5760.
44. Mylonas C., Kouretas D.(1999), Lipid peroxidation and tissue damage, *in vivo*, 13:295-310
45. Nagao A., Seki M. and Kobayashi H.. Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids. *Biosci.Biotechnol.Biochem.*,63 (10), 1787-1790,1999.
46. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, et al. (2006). A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290 (3): F625–631.
47. Nakane T., Asayama K., Koderia K., Effect of selenium deficiency on cellular and extracellular glutathione peroxidases : immunochemical detection and mRNA analysis in rat kidney and serum. *Free radic Biol Med* 1998;25:504-11.
48. Nakajima M, Takeuchi T, Takeshita T, Morimoto K. 8-Hydroxydeoxyguanosine in human leukocyte DNA and daily health practice factors: effects of individual alcohol sensitivity. *Environ Health Perspect* 1996; 104:1336 –1338.
49. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C (March 2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol. Rev.* 58 (1): 87–114.
50. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1986;548:87–99.
51. Παπακώστα- Τασοπούλου Δέσποινα, (2005) Ψυχανθή,Καρποδοτικά, χορτοδοτικά. Θεσσαλονίκη, Σύγχρονη Παιδεία.
52. Pietri S. Seguin JR. Darbigny P. et al. Ascorbyl freeradical—a noninvasive marker of oxidative stress in human open heart surgery. *Free Radic Biol Med* 1994;16:523-8.
53. Poulsen HE, Loft S, Vistisen K. Increased oxidative DNA damage after 30 days of vigorous exercise. *J Toxicol Environ Health* 1993; 40:459–462.
54. Reid MB. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle. Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001; 90:724-31.
55. Reid MB, Haack KE, Franchek KM, et al. Reactive oxygen in muscle I: intracellular oxidant kinetics and fatigue *in vitro*. *J Appl Physiol* 1992; 73 (5): 1797-804.
56. Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., (2005), Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:287-306

57. Sebaldt R. J., Adams D. O. and Uhing R. J., Quantification of contributions of phospholipid precursors to diradylglycerols in stimulated mononuclear phagocytes. *Biochem J.* 1992 June 1; 284(Pt 2): 367–375.
58. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33:368-370.
59. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J* 1996; 10:709-20.
60. Sies, H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press.
61. Sjodin B, Hellsten Westing Y, et al. Biochemical mechanism for oxygen free radical information during exercise. *Sports Med* 1990; 10: 236-54.
62. Stagos D., Kazantzoglou G., Magiatis P., Mitaku S., Anagnostopoulos K., Kouretas D., (2005), Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA, *International Journal of Molecular Medicine*, **15**:1013-1022
63. Stohs SJ, Bagchi D. (1995), Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radic Biol Med*, 18:321-36
64. Suzuki J, Inoue Y, Suzuki S. Changes in urinary level of 8-hydroxyguanine by exposure to reactive oxygen-generating substances. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:431– 436.
65. Tausche AK et al. (2006). Hyperuricemia and gout: diagnosis and therapy. Article in German. *Internist* . 47(5): 509–20.
66. Toncev G, et al. (2002). Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction. *Eur J Neurol*. 9(3):221-6.
67. Vasilopoulou E., Georga K., Bjoerkov Joergensen M., Naska A., Trichopoulou A., (2005), The antioxidant properties of Greek foods and the flavonoid content of the Mediterranean menu, *Bentham Science Publishers*, **5**:33-45
68. Vermerris W. & Nicholson R., 2006, *Phenolic Compound Biochemistry*. Netherlands, Springer.
69. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta*. 1987;924(3):408-19.

70. Webb A., McCullough M., (2005), Dietary lignans: Potential role in cancer prevention, *Nutrition and Cancer*, **51**:117-131
71. [www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)
72. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

